

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Liis Haljasmägi

**Regulatoorsete T-rakkude epigeneetiline iseloomustamine autoimmuunse
polüendokrinopaatiaga haigetel**

Geenitehnoloogia bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad PhD Kai Kisand

PhD Pärt Peterson

PhD Lili Milani

TARTU 2016

Regulatoorsete T-rakkude epigeneetiline iseloomustamine autoimmuunse polüendokrinopaatiaga haigetel

Regulatoorsed T-rakud (Treg) on vajalikud organismi immuuntolerantsuse säilitamisel ning neil on pärssiv toime efektor T-rakkude funktsioonile. Regulatoorsete T-rakkude peamine transkriptsioonifaktor on FOXP3, mis on vajalik Treg-ide arenguks, funktsiooniks ning stabiilsuseks. *FOXP3* geenis esineb iseloomulik demetüleeritud regioon, mida peetakse kõige usaldusväärsemaks Treg-ide markeriks. Regulatoorsete T-rakkude osakaalu vähenemine võib viia autoimmuunhaiguste tekkeni. Autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstrofia ehk APECED on autoimmuunhaigus, mille puhul on märgatud Treg-ide osakaalu vähenemist. APECED-i haigust põhjustavad mutatsioonid autoimmuunses regulaatorgeenis (*AIRE*), mille tagajärjel tekib liialt autoreaktiivseid T-rakke ning väheneb regulatoorsete T-rakkude arv. Antud uuringu käigus võrreldi APECED-i patsientide ning vastavate kontrollide perifeersete vere mononukleaarsete rakkude hulgas esinevat Treg-ide osakaalu nende epigeneetilise mustri järgi. Uuringus kasutati vastavalt T-rakkude ja Treg-ide tuvastamiseks *CD3D* ja *FOXP3* geenide diferentsiaalselt metüleeritud regioonide kvantiseerimist metülatsiooni-spetsiifilise kvantitatiivse polümeraasiahela reaktsiooni abil. Leidsime, et patsientidel on võrreldes kontrollidega vähenenud Treg-ide osakaal.

Märksõnad: Autoimmuunsus, APECED, *AIRE*, Regulatoorsed T-rakud, FOXP3

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Epigenetic characterization of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy

Regulatory T cells (Treg) are important in maintenance of immunological tolerance and they also have suppressive effect on effector T cells. Transcription factor FOXP3 is essential for Treg differentiation, function and stability. *FOXP3* gene contains specific demethylated region which is the most reliable identifier of Tregs. Decrease of regulatory T cells can lead to autoimmune diseases. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, known as APECED, is an autoimmune disease in which the percentage of Tregs is decreased. APECED is caused by mutations in the autoimmune regulator (*AIRE*) which leads to excessive release of autoreactive T cells and decrease of regulatory T cells (Treg). In this research we quantify Tregs in DNA isolated from peripheral blood mononuclear cells by epigenetic pattern between patients and controls. Differentially methylated regions of *CD3D* and *FOXP3* genes we used to identify T cells and Tregs respectively using methylation-specific quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Our results show that regulatory T cell numbers are slightly decreased in APECED patients compared to controls.

Keywords: Autoimmunity, APECED, *AIRE*, Regulatory T cells, FOXP3

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Regulaatorsed T-rakud	8
1.2 Regulaatorsete T-rakkude tüübid	8
1.2.1 Tüümusest pärinevad regulaatorsed T-rakud.....	8
1.2.2 Perifeeriast pärinevad regulaatorsed T-rakud.....	9
1.3 Regulaatorsete T-rakkude määramine	9
1.3.1 Iseloomulike pinnamarkerite järgi	9
1.3.2 Funktsiooni alusel.....	11
1.3.3 Iseloomuliku transkriptsioonifaktori FOXP3 järgi	11
1.4 Regulaatorsed T-rakud ja epigeneetika.....	12
1.4.1 Metülatsioonispetsiifiline kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon	15
1.5 APECED-i üldiseloomustus	15
1.6 Epidemioloogia.....	15
1.7 APECED-i sümptomid	15
1.8 AIRE geen ja selle mutatsioonid ning APECED sündroomi patogenees	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1 Töö eesmärgid	19
2.2 Materjal ja metoodika	19
2.2.1 Uuritav materjal.....	19
2.2.2 Genoomse DNA eraldamine	19
2.2.3 Genoomse DNA kontsentratsiooni mõõtmine	20
2.2.4 Bisulfitöötlus.....	20
2.2.5 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ja pre-amplifikatsioon	21
2.2.6 Plasmiidide kasvatus ja puhastamine.....	23
2.2.7 Plasmiidse DNA kontsentratsiooni mõõtmine	24

2.2.8 Plasmiidide restriksioon	24
2.2.9 Plasmiidide lahjendusrida	25
2.2.10 Reaalaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR).....	26
2.2.11 Andmete analüüs	27
2.3 Tulemused ja arutelu	28
2.3.1 Pre-amplifikatsioon	28
2.3.2 Metülatsiooni amplikonid	28
2.3.3 qPCR-i praimerite spetsiifilisus	30
2.3.4 <i>CD3D</i> ja <i>FOXP3</i> standardkõverad	31
2.3.4 Meetodi korratavus	32
2.3.5 Patsientide ja kontrollide koopiaarvude võrdlus	32
KOKKUVÕTE	35
SUMMARY	36
TÄNUAVALDUSED	38
KIRJANDUSE LOETELU	39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	47
LISAD	48
LIHTLITSENTS.....	51

KASUTATUD LÜHENDID

ACTH – adrenokortikotroopne hormoon, ingl. k *adrenocorticotropic hormone*

AD – Addisoni tõbi, ingl. k *Addison's disease*

AIRE – autoimmuunse regulaator, ingl. k *autoimmune regulator*

APECED – autoimmuunse poliendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia, ingl. k *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*

APS1 – 1. tüüpi autoimmuunse poliendokrinopaatia sündroom, ingl. k *autoimmune polyendocrine syndrome type 1*

bp – aluspaar, ingl. k *basepair*

CBF- β – tuumaga seonduva faktori beeta subühik, ingl. k *core-binding factor subunit beta*

CCR6 – kemokiini retseptor 6, ingl. k *chemokine receptor 6*

CD – diferentseerumise klaster, ingl. k *cluster of differentiation*

CNS – mittekodeeriv konserveerunud regioon, ingl. k *conserved non-coding sequence*

CT – ingl. k *cycle threshold*

CTLA-4 – tsütotoksiline T-lümfotsüütidega seotud proteiin 4, ingl. k *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

ETS-1 – C-ets-1 valk, ingl. k *protein C-ets-1; V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*

FOXP3 – ingl. k *forkhead box P3*

GITR – glükokortikoidide indutseeritud TNFR-iga seotud valk, ingl. k *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*

HLA-DR – inimese leukotsütaarne antigeen, ingl. k *human leukocyte antigen-antigen D related*

HP – hüpoparatüreoidism, ingl. k *hypoparathyroidism*

HP1 – heterokromatiini valk 1, ingl. k *heterochromatin protein 1*

ICOS – indutseeritav T-rakkude ko-stimulaator, ingl. k *inducible T cell co-stimulator*

IFN – interferoon, ingl. k *interferon*

IL – interleukiin, ingl. k *interleukin*

KMK – krooniline mukokutaanne kandidoos, ingl. k *chronic mucocutaneous candidiasis*

LAP – latentsusega seotud valk, ingl. k *latency-associated peptide*

MBD2 – metüül-CpG-siduva domeeni valk 2, ingl. k *methyl-CpG-binding domain protein 2*

MHC II – peamine koesobivuskompleks II, ingl. k *major histocompatibility complex II*

mTEC – tüümuse säsi epiteliaalsed rakud, ingl. k *medullary thymic epithelial cells*

MQ – deioniseeritud vesi, ingl. k *milli-Q-water*

NFAT – aktiveeritud T-rakkude tuumafaktor, ingl. k *nuclear factor of activated T cells*

PBMC – perifeerse vere mononukleaarsed rakud, ingl. k *peripheral blood mononuclear cell*

PD-1 – rakkude programmeeritud surma proteiin 1, ingl. k *programmed cell death protein 1*

PIAS1 – aktiveeritud STAT1 valgu inhibiitor, ingl. k *protein inhibitor of activated STAT1*

pTreg – perifeersed reguleeritud T-rakud, ingl. k *peripherally induced regulatory T cell*

RUNX1 – ingl. k *runt-related transcription factor 1*

STAT – ingl. k *signal transducer and activator of transcription*

TCR – T-raku retseptor, ingl. k *T cell receptor*

Teff – T-efektorrakk, ingl. k *effector T cell*

TET2 – Tet metüülsütsiini dioksügenaas 2, ingl. k *Tet methylcytosine dioxygenase 2*

TGF- β – transformeeriv kasvufaktor beeta, ingl. k *transforming growth factor beta*

TNFR2 – tuumori nekroosi faktori retseptor 2, ingl. k *tumor necrosis factor receptor 2*

Treg – reguleeriv T-rakk, ingl. k *regulatory T cell*

TSA – koe-spetsiifiline antigeen, ingl. k *tissue-specific antigen*

TSDR – reguleeritud T-rakkude spetsiifiline demetüleeritud regioon, ingl. k *Treg-specific demethylated region*

tTreg – tüümusest pärinevad reguleeritud T-rakud, ingl. k *thymus derived regulatory T cell*

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon, ingl. k *quantitative polymerase chain reaction*

SISSEJUHATUS

Regulatoorsed T-rakud (ingl. k *regulatory T cells*, Treg) moodustavad tähtsa osa inimese immuunsüsteemist, mängides olulist rolli immuuntolerantsuse säilitamisel. Treg-idel on pärssiv toime T-efektorrakkudele. Regulatoorsete T-rakkude arenguks, funktsiooniks ning stabiilsuseks on vajalik *FOXP3*-e (ingl. k *forkhead box P3*) ekspressiooni olemasolu. *FOXP3* geenis esineb iseloomulik demetüleeritud regioon, mida peetakse Treg-ide iseloomustamisel väga tähtsaks. Treg-ide osakaalu vähenemise või funktsiooni kadumise tagajärel võivad tekkida autoimmuunhaigused. Autoimmuunsus põhjustab immuunreaktsioone organismi enda kudede ning rakkude vastu. APECED (ingl. k *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*) on üheks mudelhaiguseks autoimmuunhaiguste uurimisel. APECED-i põhjustavad mutatsioonid autoimmuunses regulaatoris (ingl. k *autoimmune regulator*, AIRE), mille tagajärjel on häirunud T-rakkude negatiivne selektsioon. Tulenevalt sellest vabaneb organismi suurel hulgal autoreaktiivseid T-rakke, mis hakkavad ründama organismi enda kudesid ja rakke. Lisaks sellele on neil patsientidel vähenenud tsirkuleerivate regulatoorsete T-rakkude hulk.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on välja töötada kvantitatiivse reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (ingl. k *real-time polymerase chain reaction*, qPCR) põhine meetod, mille tulemusel oleks võimalik metülatsoonimustri põhjal määrata nii T-rakkude kui ka regulatoorsete T-rakkude osakaalu. Töö teiseks eesmärgiks on võrrelda qPCR-i põhise meetodi tulemusel regulatoorsete T-rakkude osakaalu APECED-i haigust põdevatel patsientidel ning vastavatel kontrollisikutel.

Töö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemediitsiini instituudi Molekulaarpatoloogia uurimisrühmas.

Märksõnad: Autoimmuunhaigus, APECED, AIRE, Regulatoorsed T-rakud, FOXP3

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Regulaatorsed T-rakud

Regulaatorsed T-rakud mängivad olulist rolli organismi immuuntolerantsuse säilitamisel ning autoimmuunhaiguste ära hoidmisel. Regulaatorsed T-rakud on vajalikud säilitamaks immuunsüsteemi homöostaasi (Vignali *et al.*, 2008). T-regulaatorsete rakkude arvu vähenemine või funktsiooni kadumine võib viia autoimmuunhaiguste tekkele. Teisalt, nende liigsel kuhjumisel on leitud kahjulikku mõju kasvajate ja krooniliste põletikkude korral (Sakaguchi, 2004). Kõige tähtsam Treg-ide tunnusjoon on nende immuunsüsteemi pärssiv toime (Shevach, 2009), kuid lisaks eelnevale iseloomustab neid ka sõltuvus interleukiin (ingl. k *interleukin*, IL)-2-st ning abi-T-rakkudega seotud efektor tsütokiinide ekspressiooni puudumine (IFN- γ , IL-4, IL-17) (Zeng & Chi, 2015). Treg-ide supresseeriv toime seisneb läheduses olevate efektor-T-rakkude (ingl. k *effector T cell*, Teff) funktsiooni maha surumises (Uibo *et al.*, 2015). Regulaatorsete funktsioonidega T-rakke on kirjeldatud mitmeid, kuid kõige olulisemateks peetakse ning kõige paremini on kirjeldatud CD4⁺CD25⁺ Treg-e, mille diferentseerumiseks on vajalik transkriptsioonifaktor FOXP3. Nendele rakkudele antud töös keskendutaksegi.

1.2 Regulaatorsete T-rakkude tüübid

1.2.1 Tüümusest pärinevad regulaatorsed T-rakud

Suurem osa regulaatorsetest T-rakkudest tekivad tüümuses toimuva T-rakkude diferentseerumise käigus (Huehn & Beyer, 2015). Tüümuse kooreosas viiakse tümotsüütidega kõigepealt läbi positiivne selektsioon, mille käigus selekteeritakse funktsionaalse T-raku retseptoriga (ingl. k *T cell receptor*, TCR) T-rakud. Seejärel liiguvad T-rakud tüümuse sâsisse (ingl. k *medulla*), kus negatiivse selektsiooni tulemusel elimineeritakse T-rakud, mis annavad liiga tugeva signaali organismi enda peptiidi ja MHC II-kompleksi (ingl. k *major histocompatibility complex II*) seondumisel TCR-iga. Tüümusest pärinevate Treg-ide (ingl. k *thymus derived regulatory T cell*, tTreg) areng sõltub kõrge-afiinsusega T-rakkude retseptori seondumisest organismi enda peptiidi ja MHC klass II-kompleksiga (Jordan *et al.*, 2001). Lisaks on vajalik ka IL-2 ja IL-7 olemasolu tüümuses (Malek *et al.*, 2008). tTreg-id on olulised immuuntolerantsuse säilitamisel (Sakaguchi *et al.*, 2010). Tüümuses arenevate regulaatorsete T-rakkude puhul mängib olulist rolli *AIRE* poolt vahendatud autoantigeenide ekspressioon, mis viib perifeersete antigeenide suhtes spetsiifiliste tTreg-ide tekkele (Malchow, 2013).

1.2.2 Perifeeriast pärinevad regulatoorsed T-rakud

Naiivseid T-rakke on võimalik muuta pTreg-ideks (ingl. k *peripherally induced regulatory T cell*) TGF- β (ingl. k *transforming growth factor beta*) ja retinoidhappe juuresolekul, mille tulemusel indutseeritakse naiivsetes T-rakkudes *FOXP3* ekspressioon (Chen & Oppenheim, 2003). See protsess on iseäranis oluline seedetrakti limaskestadel, kus organism puutub igapäevaselt kokku võõra, kuid ohutu antigeense materjaliga (mikrobioom, toit).

1.3 Regulatoorsete T-rakkude määramine

1.3.1 Iseloomulike pinnamarkerite järgi

Regulatoorseid T-rakke on võimalik määrata neile omaste pinnamarkerite alusel. CD25 (ingl. k *cluster of differentiation 25*) on oluline regulatoorsete T-rakkude pinnamarker. CD25 kõrget ekspressioonitaset hiirtes seostatakse Treg-ide suurenenud supressiivse funktsiooniga (Chen *et al.*, 2007; Chen & Oppenheim, 2011). Hiirtel, kellel puudub CD25 ja IL-2, on regulatoorsed T-rakud defektsed, mis viitab CD25 ja IL-2 olulisele rollile nende rakkude funktsiooni jaoks (Almeida *et al.*, 2002). Treg-id ei suuda ise IL-2 toota, kuid CD25 kõrge ekspressioonitaseme korral kasutavad regulatoorsed T-rakud ära T-efektorrakkude poolt toodetavat IL-2, kahjustades seeläbi Teff-ide levikut ja ellujäämist (Papiernik, 1998; de la Rosa *et al.*, 2004). Hiirte Treg-sid on võimalik määrata CD4 ja CD25 ko-ekspressiooni alusel (Ng *et al.*, 2001). Treg-ide määramiseks inimesel peaks kasutama lisaks teisi markereid, sest CD25 ekspresseerivad samuti inimese aktiveeritud CD4⁺ T-efektorrakud, mis teeb ainult CD25 põhjal Treg-ide defineerimise problemaatiliseks (Baecher-Allan *et al.*, 2001).

Regulatoorseid T-rakke iseloomustab madal CD127 ekspressioon, kuid selle tase erineb sõltuvalt Treg-ide asukohast ja aktivatsioonist (Cozzo *et al.*, 2003). CD4⁺CD25⁺CD127⁻ põhjal on võimalik identifitseerida inimese FOXP3⁺ regulatoorseid T-rakke (Liu *et al.*, 2006), kuid ainult ca 40%-l CD127 madala tasemega populatsioonides ekspresseeritakse *FOXP3* (Shevach, 2006) ning ka mõned mitte-supressiivsed *FOXP3* madalalt ekspresseerivad T-rakud on võimelised ekspresseerima madala tasemega CD127 (Miyara *et al.*, 2009).

CD45RA/CD45RO ekspresseerivad inimese CD4 rakud ning selle alusel on võimalik inimese CD4⁺FOXP3⁺ T-rakke jagada kolmeks fenotüübiliselt ja funktsionaalselt erinevaks populatsiooniks: CD45RA⁺CD25⁺FOXP3^{madal} ehk naiivsed Treg-id; CD45RO⁺CD25^{kõrge}FOXP3^{kõrge} ehk aktiveeritud Treg-id; CD45RO⁺CD25⁺FOXP3^{madal} ehk mitesupresseerivad T-efektorrakud (Miyara *et al.*, 2009).

Umbes 40% hiirte regulatoorsetest T-rakkudest ekspresseerivad konstitutiivselt tsütotoksilist T-lümfotsüütidega seotud proteiini neli (ingl. k *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*,

CTLA-4) (Read *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000). CTLA-4 ekspressioonitaseme põhjal on võimalik iseloomustada Treg-ide funktsionaalset taset, nimelt on näidatud, et hiirte ja inimeste Treg-id, mis on maksimaalse supressiivse aktiivsusega, omavad samaaegselt kõrget CTLA-4 ekspressioonitaset (Chen *et al.*, 2008; Jonuleit *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2010). CTLA-4 detekteerimiseks on vajalik rakusisene värvimine, mistõttu selle kasutamine Treg-ide määramisel on raskendatud.

Tuumori nekroosi faktori (ingl. k *tumor necrosis factor*, TNF) perekonda kuuluvat TNFR2 (ingl. k *tumor necrosis factor receptor 2*) ekspresseeritakse 30—40%-l hiirte Treg-ides. TNFR2-te ekspresseerivatel CD25⁺ või FOXP3⁺ rakkudel esineb kõige tugevam supressiivne aktiivsus, samal ajal kui TNFR2⁻ Treg-idel esineb minimaalne supresseeriv toime. (Chen *et al.*, 2008) TNFR2-te ekspresseeritakse konstitutiivselt ka inimese Treg-ides, samas T-efektorrakud ei ekspresseeri antud retseptorit (Annunziato *et al.*, 2002). Kombineerides TNFR2 ekspressiooni teiste markeritega, on võimalik identifitseerida inimese regulaatorseid T-rakke ka CD25^{madal} või CD25⁻ populatsioonide korral (Chen & Oppenheim, 2011). CD4⁺CD25⁺TNFR2⁺ Treg-id ekspresseerivad kõrge tasemega FOXP3-e ning omavad tugevat supresseerivat aktiivsust (Chen *et al.*, 2010). Naiivsetes FOXP3⁺ Treg-ides esineb samuti kõrge TNFR2 ekspressioonitase võrreldes naiivsete T-efektorrakkudega (Chen & Oppenheim, 2011).

Lisaks eelnevatele on Treg-ide määramiseks võimalik kasutada veel palju teisi pinnamarkereid, näiteks HLA-DR (ingl. k *human leukocyte antigen-antigen D related*), CD103, CCR6 (ingl. k *chemokine receptor 6*), CD39, LAP, GITR, PD-1, ICOS. Inimese FOXP3⁺ Treg-id võib indutseeritava T-rakkude ko-stimulaatorse retseptori (ingl. k *inducible T cell co-stimulator*, ICOS) ekspressiooni põhjal jaotada kaheks: ICOS⁺ Treg-id, mis kasutavad dendriitrakkude funktsiooni mahasurumiseks IL-10 ning T-rakkude supresseerimiseks TGF-β; ICOS⁻ Treg-id, mis kasutavad supresseerivaks funktsiooniks ainult TGF-β (Chen & Oppenheim, 2011). Latentsusega seotud peptiidi (ingl. k *latency-associated peptide*, LAP) ekspressioon indutseeritakse lühiajaliselt ainult FOXP3⁺ Treg-ides TCR-vahendatud aktivatsiooni tulemusel ning selle põhjal on võimalik eristada täielikult supressiivseid regulaatorseid T-rakke (Chen & Oppenheim, 2011; Tran *et al.*, 2009). CD39 ekspresseerivad umbes 60% inimese FOXP3⁺ rakud ja seda on võimalik kasutada kui markerit funktsionaalsete Treg-ide määramiseks patsientidel, kellel esineb põletikulisi reaktsioone (Chen & Oppenheim, 2011). Inimese ja hiirte aktiveeritud Treg-id ekspresseerivad kõrge tasemega glükokortikoidide poolt indutseeritud TNFR-seotud valku (ingl. k *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*, GITR) ning seda peetakse heaks Treg-ide markeriks (Zelenika *et al.*, 2002). Kroonilise infektsiooni korral suureneb Treg-ides programmeeritud surma valgu 1 (ingl. k *programmed cell death protein 1*,

PD-1) regulatsioon, mis omakorda suurendab Treg-ide supresseerivat aktiivsust (Park *et al.*, 2015).

1.3.2 Funktsiooni alusel

Regulatoorsete T-rakkude peamiseks iseloomujooneks on nende supresseeriv toime, mis esineb nii tüümusest kui ka perifeeriast pärinevatel regulatoorsetel T-rakkudel. Tüümusest pärinevad regulatoorsed T-rakud on olulised autoantigeenidega seondumisel, tagades tsentraalse immuuntolerantsuse (Uibo *et al.*, 2015). pTregid on olulised mittepatoogeensete võõr-antigeenide, nagu kommensiaalsete bakterite, toiduga saadud antigeenide, allergeenide, ära tundmisel, tagades limaskestade pinna, oraalse, ema-loote immuuntolerantsuse ehk perifeerse immuuntolerantsuse (Hadis *et al.*, 2011; Josefowicz *et al.*, 2012; Samstein *et al.*, 2012).

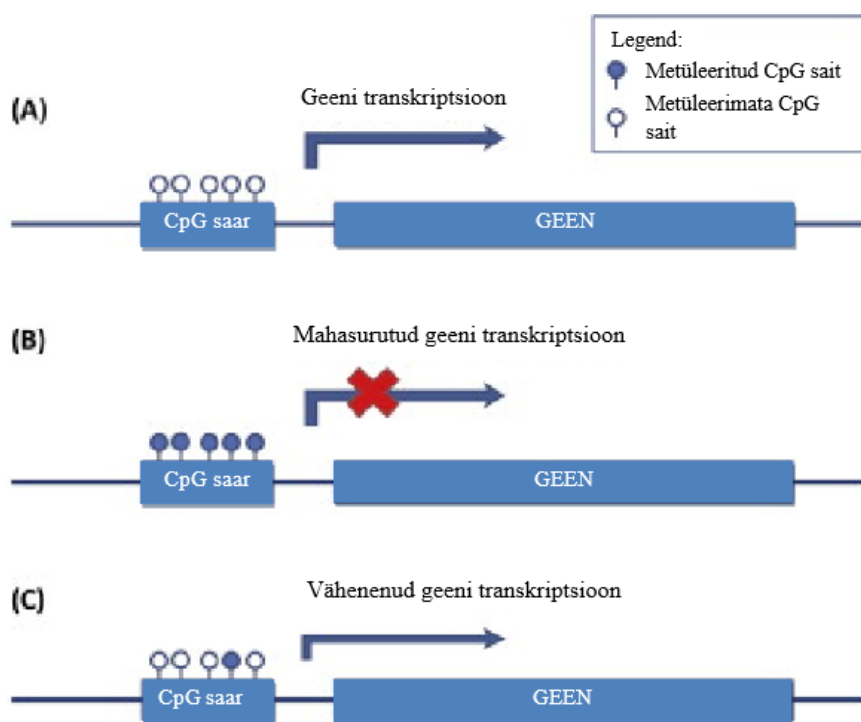
Regulatoorsete T-rakkude funktsiooni määramiseks kasutatakse laialdaselt *in vitro* supressiooni analüüsi. Analüüsi teostamiseks on vaja esmalt isoleerida regulatoorsed ja efektorrakud ning hinnata efektorrakkude jagunemist peale nende stimuleerimist erinevates efektorrakkude ja Treg-ide vahekorras. (Collison & Vignali, 2011)

1.3.3 Iseloomuliku transkriptsioonifaktori FOXP3 järgi

Regulatoorseid T-rakke on kõige enam iseloomustatud transkriptsioonifaktori *FOXP3* ekspressiooni kaudu, mis on vajalik Treg-ide arenguks, funktsiooniks ning stabiilsuseks (Overacre & Vignali, 2016). *FOXP3* ekspressiooni peatamine või nõrgestamine viib teatud efektor tsütokiinide ekspressioonini, mis on iseloomulikud abi-T-rakkude diferentseerumisradadele (Williams & Rudensky, 2007; Wan & Flavell, 2007). *FOXP3* püsiv ning katkematu ekspressioon tagab Treg-ide supresseeriva funktsiooni, nimelt kui eemaldada küpsetest Treg-idest *FOXP3* geen, on tulemuseks supresseeriva funktsiooni kadumine ning regulatsioonihäired *FOXP3* sihtmärkgeenides (Williams & Rudensky, 2007). Treg-ide diferentseerumisel tüümuses ja perifeerias on vajalik TCR-i tugev signaal, IL-2 ja TGF- β , et reguleerida *FOXP3* ekspressiooni. IL-2 signaal soodustab *FOXP3* stabiilset ekspressiooni küpsetes regulatoorsetes T-rakkudes (Rubtsov *et al.*, 2010). *FOXP3* geeni ei peeta aga kõige paremaks Treg-ide identifitseerijaks, sest seda ekspresseeritakse ajutiselt ka aktiveeritud T-efektorrakkudes, mis ei oma supresseerivat funktsiooni (Allan *et al.*, 2007). Regulatoorsete T-rakkude *FOXP3* geenis esineb iseloomulik demetüleeritud regioon, mida aktiveeritud T-rakkudel ei esine, seega peetakse kõige usaldusväärsemaks määrata Treg-sid *FOXP3* demetüleeritud regiooni kaudu.

1.4 Reguleerivad T-rakud ja epigeneetika

Epigeneetiline geeniekspressiooni regulatsioon on vajalik rakkude arenguks ning diferentseerumiseks. Epigeneetiliste mehhanismide alla kuuluvad RNA vaigistamine, DNA metülatsioon, kromatiini remodelleerimine ning histoonide modifikatsioonid. DNA metülatsioon on imetajates toimuv replikatsioonijärgne modifikatsioon, mis esineb põhiliselt CG dinukleotiidilistes järjestustes. 60—80% CG jääkidest on ülegenoomselt metüleeritud, kuid ainult 10% CpG saarekestes ning aktiivsetes reguleerivates järjestustes olevad CG jäägid on metüleeritud (Du *et al.*, 2015; Lister *et al.*, 2009; Stadler *et al.*, 2011). DNA metülatsiooni korral on pürimidiini 5' tsütosiiniga kovalentselt seondunud lisa metüülrühm ($-CH_3$). CpG saared asuvad enamasti geeni transkriptsiooni algussaidi läheduses ning on diferentseerunud rakkudes hüpometüleeritud. Aktiivsetes promooterites seonduvad CpG saarekestega transkriptsioonifaktorid ja H3K4 metüültransferaasid, mis kaitsevad neid metülatsiooni eest (Smith & Meissner, 2013). Kui promootorjärjestustes olevad CpG saared on metüleeritud, on tagajärjeks vähenenud geeniekspressioon või geeni täielik vaigistamine (Jones, 2012). (Joonis 1)



Joonis 1. CpG saarte metülatsioon. A) Promooteri läheduses asuvate CpG saarte hüpometülatsiooni korral initsieeritakse geeni transkriptsioon takistusteta. B) Kui promooteri piirkonnas asuvad CpG saared on metüleeritud, siis on geeni transkriptsioon maha surutud. C) CpG osalise hüpometülatsiooni korral võib esineda vähenenud geeniekspressiooni.¹

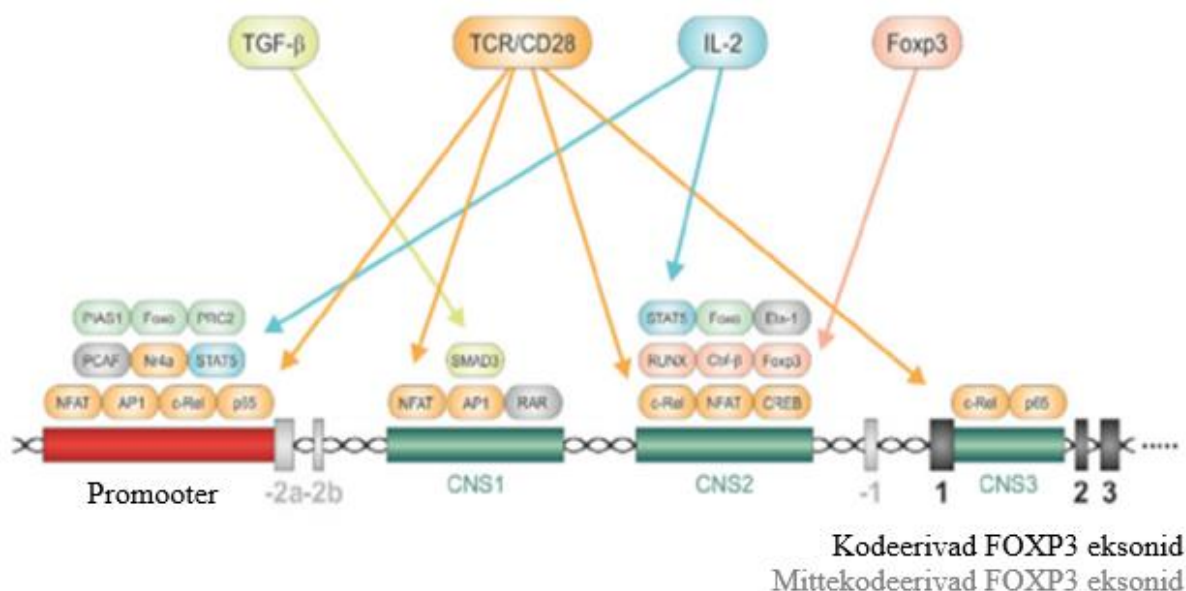
¹ [http://www.cell.com/trends/cognitive-sciences/fulltext/S1364-6613\(15\)00101-1](http://www.cell.com/trends/cognitive-sciences/fulltext/S1364-6613(15)00101-1)

Regulatoorsetes T-rakkudes esinev *FOXP3* geen on epigeneetilise kontrolli all (Kitagawa *et al.*, 2015; Ohkura *et al.*, 2013). *FOXP3* promooter asub 6,5 kb ülevalpool esimesest eksonist ning selles asuvad TATA boks, GC boks, CAAT boks ja lisaks mitmed transkriptsioonifaktorite seondumiskohad, mis asuvad umbes 500 bp ülevalpool transkriptsiooni algussaidist (Mantel *et al.*, 2006). PIAS1 (ingl. k *protein inhibitor of activated STAT1*) reguleerib negatiivselt regulatoorsete T-rakkude arengut ning värbab täiendavalt *FOXP3* promooterisse DNA metüültransferaasid ja heterokromatiin valgu ühe (ingl. k *heterochromatin protein 1*, HP1), mis hoiab ära *FOXP3* promooteri demetüleerimise ning säilitab selle epigeneetiliselt mahasurutud oleku (Liu *et al.*, 2010). TCR-i aktiveerumisel muudetakse promooter ligipääsetavaks, et sinna saaksid täiendavalt seonduda *FOXP3* ekspressiooni indutseerivad transkriptsioonifaktorid (Liu *et al.*, 2010). *FOXP3* geenis asub kolm konserveerunud mitte-kodeerivat regiooni (ingl. k *conserved non-coding sequence*, CNS), mis osalevad epigeneetilises regulatsioonis ning on vajalikud *FOXP3* ekspressiooniks (Joonis 2).

CNS1 regioon asub esimeses intronis, umbes 2 kb kaugusel *FOXP3* promooterist (Tone, 2008). CNS1 regioon on TGF- β tundlik element ning see on oluline perifeeriast pärit regulatoorsete T-rakkude arenguks, samas mittevajalik tuumusest pärinevate Treg-ide puhul (Zheng *et al.*, 2010; Josefowicz *et al.*, 2012). CNS1 piirkond ei sisalda CpG motiive ning antud regiooni reguleerivate histoonide modifikatsioonide, näiteks H3/H4 atsetülatsioon või H3K4 di- ja trimetülatsioon, esinevust on täheldatud tTreg-ide ja pTreg-ide puhul rohkem võrreldes konventsionaalsete CD4⁺ T-rakkudega (Zheng *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

CNS2 regiooni nimetatakse ka regulatoorsete T-rakkude spetsiifiliseks demetüleeritud regiooniks (ingl. k *Treg-specific demethylated region*, TSDR). Antud regioon asub esimeses intronis, umbes 4 kb kaugusel promooterist ning sisaldab rohkelt CpG motiive (Huehn & Beyer, 2015). Lisaks demetüleeritud DNA-le on Treg-ide CNS2 regioonis suurenenud ka H3K4 trimetülatsioon ning H3/H4 atsetülatsioon (Floess *et al.*, 2007). CD4⁺CD8⁺ tümotsüütides on CNS2 regioon täielikult metüleeritud ning see säilib ka CD4⁺FOXP3⁺ tümotsüütides, samas on näidatud, et juba arenevates FOXP3⁺ tümotsüütides on näha DNA osalist demetüleeritust ja küpsetes Treg-ides saavutatakse täielik demetülatsioon (Floess *et al.*, 2007; Huehn *et al.*, 2013). CNS2 piirkonna demetülatsioon saavutatakse metüül-CpG-siduva domeeni valk kahe (ingl. k *methyl-CpG-binding domain protein 2*, Mbd2) seondumisel vastava regiooniga, kaasates metüülsütosiini dioksügenaas kahe (ingl. k *Tet methylcytosine dioxygenase 2*, Tet2), mille tulemusel CNS2 regioon demetüleeritakse regulatoorsetes T-rakkudes (Wang *et al.*, 2013; Nair & Oh, 2014). CNS2 regioon on demetüleeritud nii perifeeriast kui ka tuumusest pärinevatel Treg-idel, kuid kahjuks ei ole selle põhjal võimalik eristada neid kahte alapopulatsiooni

omavahel (Ohkura *et al.*, 2012; Miyao *et al.*, 2012). CpG motiivide hüpometülatatsioon on väga vajalik *FOXP3* stabiilseks ekspressiooniks. *FOXP3* stabiilseks ekspressiooniks on vajalik Runx1 (ingl. k *runt-related transcription factor 1*) ja Cbf- β (ingl. k *core-binding factor subunit beta*), mis moodustavad trimeerse kompleksi *FOXP3*-ga ning seonduvad seejärel CNS2 piirkonnaga, edendades *FOXP3* ekspressiooni ja kaitstes CNS2 piirkonda metüleerivate ensüümide eest (Rudra *et al.*, 2009; Kitoh *et al.*, 2009). Täiendavalt on *FOXP3* püsivaks ekspressiooniks ja CNS2 regiooni võimendamiseks vajalikud Ets-1 (ingl. k *protein C-ets-1*), TCR-i poolt aktiveeritud T-rakkude tuumafaktor (ingl. k *nuclear factor of activated T-cells*, NFAT) ning IL-2 olemasolul aktiveeritav STAT5 (ingl. k *signal transducers and activator of transcription 5*) (Polansky *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014).



1.4.1 Metülatsioonispetsiifiline kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Erinevate geenilookuste metüleerituse taset on võimalik määrata spetsiifilise qPCR-i abil. Esmalt tehakse uuritavale materjalile bisulfitöötlus, mille käigus muudetakse metüleerimata tsütosiinid ning CpG dinukleotiidid uratsiiliks või UpG variandiks, mida seejärel amplifikatsiooni käigus loetakse vastavalt kas T nukleotiidina või TpG variandina. Metüleeritud tsütosiinid ja CpG dinukleotiidid jäävad muutmata. Metülatsioonispetsiifilise kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni jaoks disainitakse ühed *Forward* ja *Reverse* praimerid ning vastav sond metüleeritud järjestuse jaoks ning teised praimerid ja sond metüleerimata järjestuse jaoks. Käesolevas bakalaureusetöös kasutati T-rakkude ja Treg-ide osakaalu määramiseks *CD3D* ja *FOXP3* geenide diferentsiaalselt metüleeritud regioone. Praimerite ja sondide disainimiseks võeti eeskujuks Sehouli *et al.*, 2011 töö.

1.5 APECED-i üldiseloostus

Autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia ehk 1. tüüpi autoimmuunse polüendokrinopaatia sündroom (ingl. k *autoimmune polyendocrine syndrome type 1*, APS-1) on monogeenne autosoom-retsessiivne haigus, mida iseloomustavad mitmed autoimmuunhaigused ning krooniline kandidoos (Ahonen *et al.*, 1990; Perheentupa, 2002). Selle haiguse põhjuseks on funktsioonikaotusega mutatsioonid (ingl. k *loss-of-function*) autoimmuunses regulaator geenis.

APECED-i haigust kirjeldati esimest korda 60—70-ndatel aastatel kui haruldast haigust, mis tabab lapsi juba nende varajases eas. APS-1 haigust põhjustav defekt *AIRE* geenis avastati 1997-ndal aastal (Nagamine *et al.*, 1997).

1.6 Epidemioloogia

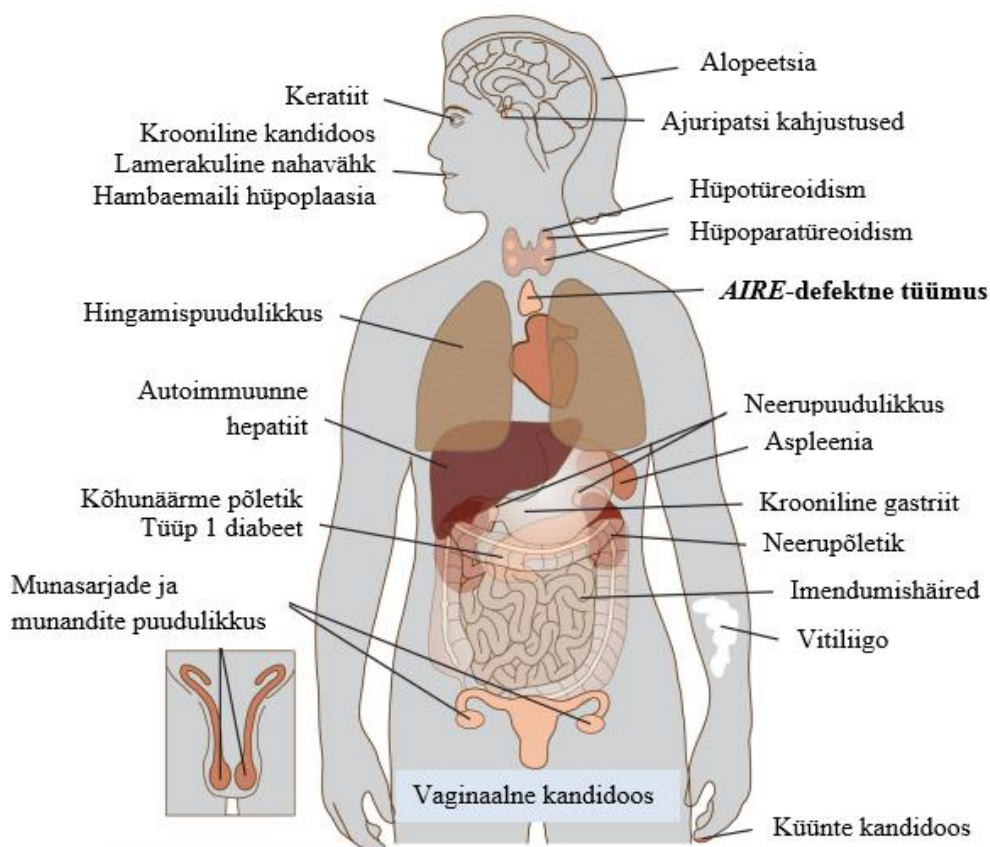
APECED on väga haruldane haigus, mille esinemist on eelkõige täheldatud ajalooliselt isoleeritud populatsioonides, näiteks iraani päritolu juutidel (1:9000; Zlotogora & Shapiro, 1992), sardiinlastel (1:14 000; Rosatelli *et al.*, 1998), soomlastel (1:25 000; Perheentupa, 2006). Lisaks on APECED-i iseloomustatud sloveenidel (1:43 000; Podkrajsek *et al.*, 2005), norrakatel (1:80 000; Myhre *et al.*, 2001) ning poolakatel (1:129 000; Stolarski *et al.*, 2006).

1.7 APECED-i sümptomid

Esimesed sümptomid tekivad juba lapseeas, vanusevahemikus 0,2—18 (Ahonen *et al.*, 1990). 75—93%-l patsientidest on esimeseks sümptomiks krooniline naha-ja limaskestade kandidoos (ingl. k *chronic mucocutaneous candidiasis*, KMK), mis tavaliselt ilmneb juba imikueas (Ahonen *et al.*, 1990; Perheentupa, 2006; Betterle *et al.*, 1998). Sellele järgneb

hüpoparatiroidism (ingl. k *hypoparathyroidism*, HP), mis tekib tavaliselt 4—5-ndal eluaastal ning edasi Addisoni tõbi (ingl. k *Addison's disease*, AD), mis tekib samuti juba lapseas (Ahonen *et al.*, 1990; Husebye *et al.*, 2009). Lisaks eelnevale kolmele haigusele võib patsientidel esineda ka palju teisi sümptomeid, seega APECED-i kliiniline pilt on väga varieeruv (Perheentupa, 2006). Keskmiselt esineb APS-1 patsientidel neli sümptomit (Ahonen *et al.*, 1990).

APECED-i patsiente võivad tabada ka tüüp 1 diabeet, hüpogonadism, lööve, autoimmuunne kilpnäärme põletik, munasarjade ja munandite puudulikkus, aneemia, autoimmuunne hepatiit, vitiliigo, alopeetsia, keratiit, keratiit, krooniline kandidoos, lamerakuline nahavähk, hambaemali hüpoplaasia, hingamispuudulikkus, hambaemali hüpoplaasia, soole talitlushäired, küünte düstroofia, trummikile lubjastumine, ajuripatsi kahjustused, neerupuudulikkus, krooniline gastriit (Joonis 3).



Joonis 3. APECED-i korral tekkivad haigused ja kahjustused. (Kisand & Peterson, 2015)

1.8 AIRE geen ja selle mutatsioonid ning APECED sündroomi patogenees

APECED on põhjustatud mutatsioonist autoimmuunses regulaatoris. *AIRE* geen asub 21-se kromosoomi q22.3 regioonis ning kodeerib 58 kDa suurust valku. *AIRE* geen avaldub põhiliselt tüümuse säsi epiteeli rakkudes (ingl. k *medullary thymic epithelial cells*, mTEC), kuid seda leidub ka dendritrakkude alapopulatsioonides lümfisõlmedes ja mandlites (Heino *et al.*, 1999;

Poliani *et al.*, 2010; Gardner *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007). AIRE valk on transkriptsioonifaktor, mis aktiveerib mTEC-ides olevad koe-spetsiifilised antigeenid (ingl. k *tissue-specific antigen*, TSA). AIRE on vajalik T-rakkude diferentseerumisel negatiivses selektsioonis, mille käigus mTEC-id esitlevad tümotsüütidele autoantigeene, tagades potentsiaalselt autoreaktiivsete T-lümfotsüütide apoptoosi ning TSA-spetsiifiliste reguleerivate T-rakkude tekke (Liston *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2002; Malchow *et al.*, 2013; Kyewski & Derbinski, 2004). AIRE mängib lisaks olulist rolli mTEC-ide lõplikul küpsemisel (Yano *et al.*, 2008; Matsumoto, 2011). AIRE-defektsetel hiirtel esinevad hálbed mTEC-ide küpsemisel, mille tagajärgedeks on tümotsüütide hiline migratsioon, TSA-de ebapiisav esitlemine ning mTEC rakkude surm, mis kutsub esile immuunsüsteemi aktivatsiooni organismi enda kudede vastu (Laan & Peterson, 2013; Anderson *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2014).

AIRE geen on kirjeldatud mitmeid mutatsioone, millest enamik asuvad geeni kodeerivas alas. Mutatsioonid jagunevad enamjaolt kolmeks: nonsense, raaminihke ning missense mutatsioonid. (Peterson *et al.*, 2004) Kaks kõige levinumat mutatsiooni on R257X mutatsioon (arginiini asendus 257. positsioonis) kuuendas eksonis ja 13-ne aluspaari pikkune deletsioon (967—979del13bp) kaheksandas eksonis (Nagamine *et al.*, 1997). R257X mutatsioon esineb kõige enam soomlastest APECED-i patsientidel, moodustades 83% haigestunud alleelidest ning samuti Euroopast pärit põlvkondadel (Nagamine *et al.*, 1997; Björnses *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 1998). 967—979del13bp deletsioon on kõige tavalisem APS-1 patsientidel, kes pärinevad Põhja-Ameerikast, Suurbritanniast ja Norrast (Scott *et al.*, 1998; Heino *et al.*, 1999; Björnses *et al.*, 2000). Sardiiniast pärinevate APECED-i patsientide hulgas on kõige levinum R139X mutatsioon (Rosatelli *et al.*, 1998) ning iraanlastest juutide hulgas domineerib Y85C mutatsioon (Björnses *et al.*, 2000). Vastavad mutatsioonid toovad kaasa AIRE transkriptsioonilise aktiivsuse languse ning valgu vale paiknemise rakus (Ferguson *et al.*, 2008). Siiaamaani ei ole leitud kindlat seost AIRE mutatsioonide ning APECED-i sümptomite vahel, kuid huvitava seosena avastati, kuidas R139X ja R257X mutatsiooni omavatel patsientidel tekib 100%-lise tõenäosusega kandidoos (Kisand *et al.*, 2010; Kisand *et al.*, 2011).

AIRE puudulikkuse korral võib kudede ja organite autoimmuunne kahjustus tekkida nii autoreaktiivsete T-rakkude ülemäärase tüümusest vabanemise tõttu kui ka ebapiisava reguleerivate rakkude populatsiooni kujunemise läbi. APECED-i hiiremudelil ehk AIRE-defitsiitsetel hiirtel on veenvalt näidatud autoreaktiivsete tümotsüütide puudulikkude negatiivset selektsiooni (Anderson *et al.*, 2002; Liston *et al.*, 2003). Patsientide puhul pole seda otseselt uuritud. Küll aga on reguleerivate T-rakkude arv vähenenud nii APECED-i patsientidel (Ryan

et al., 2005; Kekäläinen *et al.*, 2007; Laakso *et al.*, 2010; Wolff *et al.*, 2010) kui ka AIRE-puudulikel hiirtel (Malchow, 2013; Malchow *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalse osa eesmärkideks on

- Juurutada TaqMan proovil põhinev qPCR-i meetod, mille põhjal oleks võimalik määrata vererakkudest isoleeritud DNAs T-rakkude ja reguleerivate T-rakkude osakaalu metülatsioonimustri põhjal;
- Võrrelda epigeneetiliselt määratud reguleerivate T-rakkude osakaalu APECED-i patsientidel ning kontroll-isikutel.

2.2 Materjal ja meetoodika

2.2.1 Uuritav materjal

Töö eksperimentaalse osa läbiviimiseks kasutati seitsme Soome APECED-i patsiendi (vanuses 20-69) ja kaheksa ealiselt sobitatud kontrollisiku (vanuses 20-61) vere mononukleaarsete rakkude sadet (ingl. k *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC). Uuring on kooskõlastatud Helsingi ülikooli inimuuringute eetikakomitee poolt ning kõik uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusolekulehe. Käesolevas uuringus kasutati kaheksa naissoost (3 patsienti ja 5 kontrolli) ning seitsme meessoost (4 patsienti ja 3 kontrolli) isiku materjali.

2.2.2 Genoomse DNA eraldamine

Genoomse DNA eraldamine teostati QIAamp *MinElute Microkitiga* (Qiagen). Rakkudele lisati 100 µl puhverlahust (*Buffer ATL*), 10 µl proteinaas K lahust (*Proteinase K solution*), 100 µl puhverlahust (*Buffer AL*) ning segati 15 sekundit vortex-il (*Reax top*, Heidolph). Seejärel inkubeeriti proove 56°C kraadi juures (*Thermo-Block TDB-120*, Biosan) 20 minutit ning tsentrifuugiti 10 sekundit 13 200 rpm. Lisati 50 µl etanooli (96%), segati vortex-il 15 sekundit, inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril ning seejärel tsentrifuugiti 10 sekundit 13 200 rpm. Lüsaat tõsteti QIAamp *MinElute* kolonni (2 ml *collection tube*) ning seejärel tsentrifuugiti 8000 rpm 1 minut (*Centrifuge 5415 D*, rootor F45-24-11, Eppendorf), eemaldati läbijooks. Järgnevalt teostati kaks pesu – lisati 500 µl esimest pesupuhvrit (AW1), tsentrifuugiti 1 minut 8000 rpm ning seejärel lisati 500 µl teist pesupuhvrit (AW2), tsentrifuugiti 1 minut 8000 rpm ja eemaldati läbijooks. Tsentrifugiti veel 3 minutit maksimaalsel kiirusel (13 200 rpm), et membraan täielikult kuivatada. Järgnevalt asetati QIAamp *MinElute* kolonnid puhastesse 1,5 ml tuubidesse ning lisati 50 µl MQ-d (deioniseeritud vesi, ingl. k *Milli-Q water*, Millipore Corporation) selliselt, et vesi kataks maatriksi. Tuubide kaaned suleti, inkubeeriti

toatemperatuuril 5 minutit ning genoomse DNA elueerimiseks tsentrifuugiti proove 1 minut maksimaalsel kiirusel. Genoomne DNA säilitati -20°C juures.

2.2.3 Genoomse DNA kontsentratsiooni mõõtmine

Genoomse DNA eraldamisele järgnes proovide kontsentratsiooni ning puhtuse mõõtmine *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) spektrofotomeetriga. Mõõtmiseks nulliti spektrofotomeetri taust 1 µl MQ vastu ning gDNA kontsentratsiooni mõõtmiseks võeti 1 µl proovi. Lahuse neeldumist mõõdeti 230, 260 ja 280 nm juures.

2.2.4 Bisulfittöötlus

Metülatsoonimustri määramiseks teostati genoomsele DNA-le bisulfittöötlus. Bisulfittöötluse käigus konverteeritakse metüleerimata tsütosiinid uratsiiliks ning metüleeritud tsütosiinid jäävad puutumatuks. Töötlus teostati *EZ DNA Methylation* kitiga (Zymo Research). Eelnevalt valmistati töötluseks ette M-Wash Buffer, milleks lisati 24 ml M-Wash Buffer kontsentraadile (D5002) 96 ml 100%-list etanooli ja CT Conversion Reagent, milleks lisati CT Conversion Reagent tuubile (puru) 750 µl vett (MQ) ja 210 µl puhverlahust (*M-Dilution Buffer*) ning segati toatemperatuuril 10 minutit väristajal (*Multi-Vortex V-32*, Biosan) pimedas. 600 ng gDNA-le lisati 5 µl puhverlahust (*M-Dilution buffer*) ning reaktsioonimaht viidi MQ-ga 50 µl-ni. Proove inkubeeriti 15 minutit 37°C (*Thermo-Block TDB-120*, Biosan) juures. Seejärel lisati proovidele 100 µl CT Conversion Reagenti ning segati pipetiga läbi. Proove inkubeeriti üleöö järgmise programmiga (*Mastercycler gradient 120V*, Eppendorf): 30 sekundit 95°C juures, 1 tund 50°C juures ning seda korrati 16 tsükli, seejärel hoiti proove 4°C juures. Järgnevalt pipeteeriti 400 µl puhverlahust (*M-Binding Buffer*) *Zymo-Spin IC* kolonnidele, tõsteti kolonnid kogumistuubi, lisati proovid ning segati kolonni tagurpidi pöörates läbi. Tsentrifuugiti 30 sekundit täiskiirusel 13 200 rpm (*Centrifuge 5415 D*, rootor F45-24-11, Eppendorf), eemaldati läbijooks. Kolonnile pipeteeriti 200 µl puhverlahust (*M-Wash Buffer*), tsentrifuugiti 30 sekundit täiskiirusel ning eemaldati läbijooks. Lisati kolonnile 200 µl puhvrit (*M-Desulphonation Buffer*), inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit, tsentrifuugiti 30 sekundit täiskiirusel ning eemaldati läbijooks. Järgnevalt teostati kaks pesu puhverlahusega (*M-Wash Buffer*) ning tsentrifuugiti vastavalt esimesel pesul 30 sekundit ning teisel pesul 1 minut täiskiirusel, eemaldati läbijooks. Kolonn asetati uude 1,5 ml tuubi ning elueeriti 50 µl MQ-ga, tsentrifuugiti 30 sekundit täiskiirusel. Bisulfit-DNA-d säilitati -20°C juures.

2.2.5 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ja pre-amplifikatsioon

Bisulfitöötluse õnnestumise kontrollimiseks tehti proovidele PCR. Valmistati PCR-reaktsioonisegud, mille kogumaht ühe reaktsiooni kohta oli 25 µl ning sisaldas järgmisi komponente (Tabel 1):

Tabel 1. PCR-il kasutatud reagentid, mahud ning lõppkontsentratsioonid.

Reagent	Maht	Lõppkontsentratsioon
10X Yellow Buffer (Naxo)	2,5 µl	1X
25 mM MgCl ₂ (Solis BioDyne)	1,5 µl	1,5 mM
2 mM dNTP segu (Solis BioDyne)	1,5 µl	0,12 mM
5U/µl HOT FirePol DNA polümeraas (Solis BioDyne)	0,3 µl	1,5 U
MQ	17,2 µl	N/A
5 µM F + R praimerite segu	1 µl	0,2 µM
Bisulfitöödeldud DNA	1 µl	12 ng

Praimerite 5 µM F+R segu jaoks võeti 20 µl nii *Forward* kui ka *Reverse* praimereid (100 µM) ning lisati 360 µl MQ-d (Tabel 2). Reaktsioonisegud valmistati 0,2 ml katsutitesse ning segati multi-vortexil (*MSC-300*, *Multi-Spin*, Biosan). Seejärel pandi proovid termotsüklerisse (*Mastercycler gradient 120V*, Eppendorf) järgneva programmiga:

Algne denaturatsioon	95°C	15 minutit
Denaturatsioon	95°C	20 sekundit
Praimerite seondumine	56°C	30 sekundit
DNA süntees	72°C	1 minut
Kokku 40 tsüklit		
Lõpp elongatsioon	72°C	3 minutit

Järgnevalt vaadeldi PCR-i produkte 1,5%-lises agarosgeelis geelelektroforeesil. Agarosgeeli valmistamiseks kasutati 1x TAE puhvrit, kuhu lisati 5 µl etiidiumbromiidi (10mg/ml, Naxo). Geeli hammastesse kanti 5 µl PCR-i produkti ning kõrvale 5 µl pikkusmarkerit 100 bp *DNA Ladder Ready to Load* (0,1 µg/µl, Solis BioDyne). Bisulfitöödeldud DNA visualiseerimiseks kasutati UV valgust ning PCR-i produkte säilitati -20°C juures.

Tabel 2. PCR-il kasutatud praimerid.

Geen	<i>Forward</i> 5' → 3'	<i>Reverse</i> 3' → 5'
<i>CD3D</i>	AGGAAGAGAGGAATTATTA GTTTGGGTGAGAGTTG	CAGTAATACGACTCACTATAGGGAG AAGGCTAATCCTAAAAAAATCAAC CTCCAT
<i>FOXP3</i>	AGGAAGAGAGATTTGTTTGG GGGTAGAGGATTTAG	CAGTAATACGACTCACTATAGGGAG AAGGCTACCCCAAAAATCCCAATAT CTATAA

Tulenevalt bisulfittöödeldud DNA kontsentratsioonist (12 ng/μl) teostati järgnevalt pre-amplifikatsioon, et qPCR-i jaoks materjali kogust suurendada. Kasutati samasid praimereid, mis eelmises PCR-is (Tabel 2). Valmistati PCR-i reaktsioonisegud, mille kogus ühe reaktsiooni kohta oli 25 μl ning sisaldas järgmisi komponente (Tabel 3):

Tabel 3. PCR-il kasutatud reagentid, mahud ning lõppkontsentratsioonid.

Reagent	Maht	Lõppkontsentratsioon
10X Yellow Buffer (Naxo, Eesti)	2,5 μl	1X
25 mM MgCl ₂ (Solis BioDyne)	1,5 μl	1,5 mM
2 mM dNTP segu (Solis BioDyne)	1,5 μl	0,12 mM
5U/μl HOT FirePol DNA polümeraas (Solis BioDyne)	0,3 μl	1,5 U
MQ	16,7 μl	N/A
5 μM F + R praimerite segu	1 μl	0,2 μM
Bisulfittöödeldud DNA	1,5 μl	18 ng

Reaktsioonisegud valmistati 0,2 ml katsutitesse ning segati multi-vortexil. Proovid pandi termotsüklerisse järgmise programmiga:

Algne denaturatsioon	95°C	15 minutit
Denaturatsioon	95°C	20 sekundit
Praimerite seondumine	56°C	30 sekundit
DNA süntees	72°C	1 minut
Kokku 25 tsükli		
Lõpp elongatsioon	72°C	3 minutit

2.2.6 Plasmiidide kasvatus ja puhastamine

Standardkõvera tegemise eesmärgil telliti valitud geenidele vastavad spetsiifilised plasmiidid, mis kujutasid endast pUC57 kloonimisvektorit, kuhu oli kloonitud *CD3D* ja *FOXP3* CpG/TpG spetsiifilised järjestused (Lisa 1). Tellitud plasmiide oli vaja lahustada ning sisestada uuesti bakterisse *Escherichia coli* (tüvi *NOVA XG*), et materjali kogust suurendada. Kõigepealt lisati GENWIZ-st saadetud plasmiididele (igat plasmiidi oli lüofiliseeritult 4 µg) lahustamiseks 20 µl TE puhvrit. *E. coli* kompetendid võeti 5—7 minutiks -80°C kapist jääle sulama. Eelnevalt lahustatud plasmiididest pipeteeriti igast plasmiidist 2 µl tuubi põhja ning asetati 2—3 minutiks jääle. Seejärel pipeteeriti jää peal iga plasmiiditilga peale 100 µl kompetentseid rakke ning segati otsikuga mõned korrad. Tuubid jäeti 30 minutiks jää peale ning segati nipsutades paar korda. Järgnevalt tehti bakteritele kuumašokk ehk tuubid pandi 3 minutiks 37°C kraadisesse soojablokki ning peale seda kohe jääle paariks minutiks. Teostati plasmiidide kosutamine 1000 µl LB-ga (*lysogeny broth*), segati pipetiotsikuga 3—4 korda läbi ning pandi 60 minutiks kasvama 37°C juurde. Samal ajal pandi LB + amp tardsöötme Petri tassid 37°C kappi soojenema. Järgnevalt teostati plasmiidide plaatimine: rakke tsentrifuugiti 3 minutit 6000 rpm (*Sorvall RC5B plus*, rootor AF6.250, Kendro), et rakud põhja langeks. Üleliigne sööde pipeteeriti rakkudelt ja seejärel rakud suspendeeriti 50 µl-s. Plaadile pipeteeriti 50 µl rakke, tõmmati spaatliga poolele plaadile laiali ning edasi tõmmati nõelaga üksikkolooniad teisele tassipoolele. Tassid pandi üleöö kasvama 37°C kappi. Järgmisel päeval tõsteti kolooniatega tassid 4°C kappi. Plasmiidide kasvatuseks valati kolbi 100 ml LB, 100 µl amp ning 6 suurt kolooniat. Kolvid asetati 37°C kraadi loksutajale 18 tunniks. Bakterit tsentrifuugiti 15 minutit 4000 rpm.

Midipreppide valmistamiseks plasmiididest kasutati *Nucleobond Xtra Midi EF* kitti (Macherey-Nagel). Fuugitud bakteritele lisati 8 ml puhverlahust (*Buffer RES-EF*) ning lüüsi efektiivsemaks toimumiseks suspendeeriti rakke seni, kuni lahus muutus selgeks. Lisati 8 ml lüüsipuhvrit (*Buffer LYS-EF*), segati õrnalt tuube tagurpidi pöörates ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. *Nucleobond Xtra* kolonnides olevad filtrid tasakaalustati, lisades 15 ml tasakaalupuhvrit (*Buffer EQU-EF*) ning oodati kuni kolonnid tühjenesid. Lüüsitud bakteritele pipeteeriti 8 ml neutraliseerimis puhvrit (*Buffer NEU-EF*) ning segati õrnalt tagurpidi pöörates nii kaua, kuni proovid muutusid sinisest värvusest värvituks. Seejärel inkubeeriti lüsaate jää peal 5 minutit ning kanti tasakaalustatud kolonnidele. Kui lüsaat oli läbi tilkunud, lisati kolonnides olevatele filtritele ettevaatlikult 5 ml esimest pesupuhvrit (*Buffer FIL-EF*) ning oodati kuni kolonnid tühjenesid. Kolonnidest eemaldati filtrid. Järgnevalt pesti kolonne 35 ml pesupuhvriga (*Buffer ENDO-EF*) ja oodati kuni kolonnid tühjenesid. Kolmandaks kolonni

pesuks lisati 15 ml pesupuhvrit (*Buffer WASH-EF*) ning oodati kolonnide tühjenemiseni. Kolonnid tõsteti uutesse 15 ml tuubidesse ja lisati 5 ml elueerimispuhvrit (*Buffer ELU-EF*). Elueeritud plasmiidse DNA sadestamiseks lisati kolonni 3,6 ml toatemperatuuril olevat isopropanooli ning segati vortexil (*Reax top*, Heidolph). Tsentrifugiti 60 minutit 4000 rpm (*Sorvall RC5B plus*, rootor AF6.250, Kendro) ja eemaldati ettevaatlikult supernatant. Lisati 2 ml endotoksiini vaba toatemperatuuril olevat 70%-list etanooli nii, et sade tuleks põhjast lahti, tsentrifuugiti 15 minutit 4000 rpm. Peale fuugimist eemaldati klaaspipetiga etanool nii, et tuub oleks hästi kuiv ning sade lahustati 500 µl-s endotoksiinide vabas puhvris (*Buffer TE-EF*). Tuubid tõsteti 10 minutiks 60°C kappi, seejärel tõsteti ümber epsidesse.

2.2.7 Plasmiidse DNA kontsentratsiooni mõõtmine

Midipreppide valmistamisele järgnes plasmiidse DNA kontsentratsiooni ning puhtuse mõõtmine NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga. Mõõtmiseks nulliti spektrofotomeetri taust 1 µl TE-EF puhvri vastu ning plasmiidse DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks võeti 1 µl proovi. Lahuse neeldumist mõõdeti 230, 260 ja 280 nm juures.

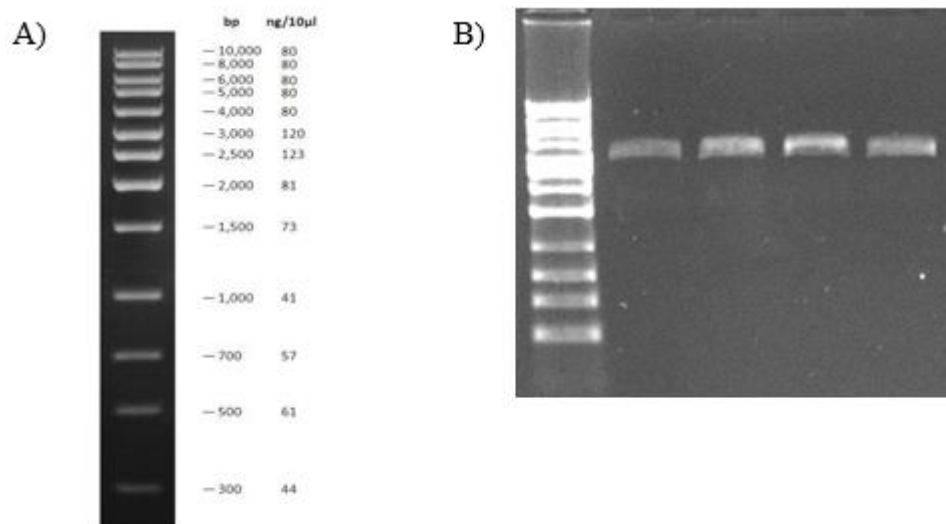
2.2.8 Plasmiidide restriksioon

Plasmiidide lineariseerimiseks teostati järgnevalt restriksioon. Valmistati reaktsioonisegu, mille koguseks ühe reaktsiooni kohta oli 30 µl ning segu sisaldas (Tabel 4):

Tabel 4. Restriksioonil kasutatud reagentid, mahud ning lõppkontsentratsioonid.

Reagent	Maht	Lõppkontsentratsioon
10x ScaI Buffer (Thermo Fisher Scientific)	3 µl	1X
Ensüüm ScaI (Thermo Fisher Scientific)	1 µl	10 U
Plasmiid	vastavalt arvutustele	1 µg
MQ	vastavalt arvutustele	N/A

Proovid segati vortex-il (*Reax top*, Heidolph), tsentrifuugiti ning pandi 37 °C kappi 90 minutiks. Restriksiooni õnnestumise hindamiseks vaadeldi proove 0,8%-lises agarosgeelis elektroforeesil. Agarosgeeli valmistamiseks kasutati 1X TAE puhvrit, millele lisati 7,5 µl etiidiumbromiidi (10mg/ml, Naxo). Geeli hammastesse kanti 6 µl proovi (1 µl plasmiid + 2 µl värv + 3 µl puhvrit) ning kõrvale 6 µl DNA markerit 1 kb *DNA Ladder Ready to Use* (0,1 µg/µl, Solis BioDyne). Plasmiidse DNA visualiseerimiseks kasutati UV valgust (Joonis 4) ning proove säilitati -20°C juures.



Joonis 4. A) 1 kb DNA Ladder Ready to Use. B) Illustratiivne geelelektroforeesi pilt UV valguse all, mis näitab restriktiooni produkte. Näeme pildil üksikuid plasmiidse DNA bände ning kõikide bändide suurused jäävad 3000 bp juurde, mis näitab restriktiooni õnnestumist.

Restrikteeritud plasmiidid puhastati reaktsioonisegust *GENEJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit*-iga (Thermo Fisher Scientific). Lisati vastavalt arvutustele MQ-d, et viia reaktsioonimaht 200 µl-ni. Seejärel lisati 100 µl puhvrit (*Binding Buffer*) ning segati korralikult läbi. Lisati 300 µl 96%-st etanooli ja segati läbi. Proovid tõsteti kolonnidele (*DNA Purification Micro Column*), tsentrifuugiti 1 minut 12 300 rpm (*Centrifuge 5415 D*, rootor F45-24-11, Eppendorf) ning visati ära läbijooks. Kolonnidele lisati 700 µl pesupuhvrit (*Wash Buffer*), tsentrifuugiti 1 minut 12 300 rpm, visati ära läbijooks ning korralati sama punkti. Tsentrifuugiti lisaks 1 minut 12 300 rpm, et täielikult eemaldada pesupuhvri jääke. Proovid tõsteti ümber 1,5 ml tuubidesse ning lisati 10 µl elueerimispuhvrit (*Elution Buffer*) kolonni keskel olevale membraanile ning tsentrifuugiti 1 minut 12 300 rpm. Lineariseeritud plasmide säilitati -20°C juures.

Lineariseeritud plasmiidse DNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga. Mõõtmiseks nulliti spektrofotomeetri taust 1 µl TE-EF puhvri vastu ning plasmiidse DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks võeti 1 µl proovi. Lahuse neeldumist mõõdeti 230, 260 ja 280 nm juures.

2.2.9 Plasmiidide lahjendusrida

Spektrofotomeetriga saadud plasmiidse DNA kontsentratsioonid (ng/µl) teisendati ümber g/L kujule. Järgnevalt arvutati iga plasmidi molaarmass (ingl. *k formula weight*, F.W.) valemi järgi

$F.W. = \text{plasmidi suurus (bp)} \times 662 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, Lineariseeritud plasmidi molaarse

kontsentratsiooni (M) leidmiseks kasutati valemit $M = \frac{\text{mol}}{L} = \frac{g}{F.W.} \div 1L$. Seejärel leiti

lineariseeritud plasmiidide koopiaarv μl kohta $\frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 6,02 \times 10^{23}$ valemi põhjal. 10^9 lahjenduse tegemiseks arvutati $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ valemi alusel plasmiidse DNA ning puhvri (9 ml MQ + 1 ml 10x TE + 2 μl Salmon Sperm DNA) hulk. Seejärel tehti 10^9 - 10^1 lahjendusrida. Standardkõvera tegemiseks tehti plasmiididest 10^8 - 10^2 lahjendusrida.

2.2.10 Reaalaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

Viidi läbi TaqMan qPCR (*ViiA™ 7 Real-Time PCR System*, Applied Biosystems), milleks valmistati reaktsioonisegud, mille kogus ühe reaktsiooni kohta oli 33,4 μl ning sisaldas järgnevaid komponente (Tabel 5):

Tabel 5. qPCR-il kasutatud reagentid, mahud ning lõppkontsentratsioonid.

Reagent	Maht	Lõppkontsentratsioon
5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX, Solis Biodyne)	6,68 μl	1X
5 μM F+R praimerite mix	10,03 μl	1,5 μM
5 μM TaqMan sond	1,67 μl	0,25 μM
MQ	12,02 μl	N/A
Pre-amplifitseeritud bisDNA	3 μl	N/A

Praimerite 5 μM F+R segu jaoks võeti 20 μl *Forward* ja *Reverse* praimereid (100 μM) ning lisati 360 μl MQ-d (Tabel 6). 5 μM TaqMan sondi saamiseks lisati 5 μl sondile (100 μM) 95 μl MQ-d. Reaktsioonisegud valmistati eraldi iga praimeri jaoks 1,5 ml tuubi, segati vortexil (*Reax top*, Biosan) ning seejärel tõsteti 30,4 μl kaupa laiali 0,2 ml epsidesse. Epsidesse lisati 3 μl vastavat pre-amplifitseeritud bisulfitöödeldud DNA-d, kontrolliks kõrvale 3 μl MQ-d ning standardkõvera jaoks 3 μl 10^8 – 10^2 plasmiidide lahjendusi. Proovid segati Multi-Spin vortexil (1600 rpm, 5 sek, 10 tsüklit) (*MSC-300, Multi-Spin*, Biosan) ning pipeteeriti 384-plaadile 10 μl kaupa kolmes korduses. 384-plaat kiletati ning tsentrifuugiti 300 rcf 3 minutit (*Centrifuge 5810 R*, rootor A-4-62, Eppendorf). 384-plaat pandi ViiA 7 masinasse järgneva programmiga:

95 °C 15 minutit

95 °C 15 sekundit

60 °C 1 minut

Kokku 45 tsüklit

Tabel 6. Kasutatud praimerid ja sondid:

Geen	<i>Forward</i> 5' → 3'	<i>Reverse</i> 3' → 5'
<i>CD3D</i> CpG	GTGGTTTGAATTTTAGCGT	AAATCTAACTACTACGACTTAC
<i>CD3D</i> CpG sond	TCGTCGGTTTTATAGCGT	
<i>CD3D</i> TpG	GGTGGTTTGAATTTTAGTGT	AAAAATCTAACTACTACAACCTT AC
<i>CD3D</i> TpG sond	GAGAAGTTGTTGGTTTTATAGTGTAAG	
<i>FOXP3</i> CpG	GTTTTTCGATTTGTTTAGATTT TTTCGTT	CCTCTTCTCTTCCTCCGTAATAT CG
<i>FOXP3</i> CpG sond	ATGGCGGTCGGATGCGTC	
<i>FOXP3</i> TpG	GTTTTTGATTTGTTTAGATTT TTTTGTT	CCTCTTCTCTTCCTCCATAATAT CA
<i>FOXP3</i> TpG sond	ATGGTGGTTGGATGTGTTGGGTT	

2.2.11 Andmete analüüs

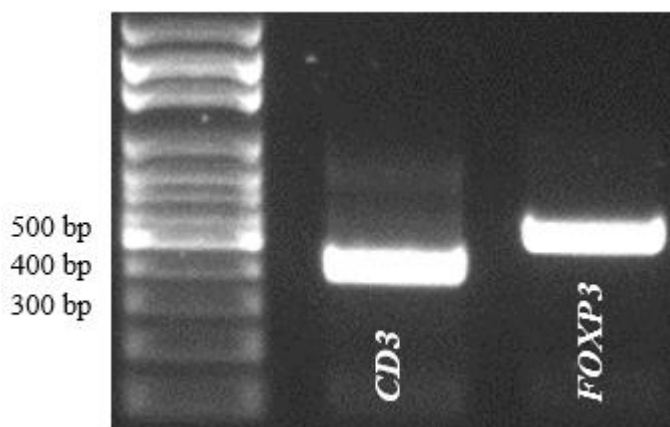
Katsed viidi läbi kahes korduses. Tulemuste all toodud katseandmete graafikud joonistati GraphPad Prism 5.0 programmiga (*GraphPad Software, Inc*), mille abil viidi läbi Studenti t-test. Statistiliselt oluliseks loeti tulemusi, mille p väärtus <0,05. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena ning graafikutel on esitatud ka standardhälve (ingl. k *standard deviation*, SD).

2.3 Tulemused ja arutelu

Uurimisrühma liikmete poolt eraldati patsientide ning kontrollide verest perifeersed mononuklearsed rakud, millest antud töö autor eraldas genoomse DNA ning sellega teostati edasised eksperimentid.

2.3.1 Pre-amplifikatsioon

Bisulfitöötluse järgselt tehti materjalile reaallaja PCR-i jaoks 25-tsükliline pre-amplifikatsioon, et materjali kogust suurendada. Pre-amplifikatsioonil kasutati bisulfitöödeldud DNA põhiseid praimereid, mis disainiti uurimisgrupi liikmete poolt. Selleks, et kontrollida pre-amplifikatsiooni praimerite toimimise efektiivsust ning bisulfitöötluse õnnestumist, tehti proovidele 40-e tsükliga PCR. Antud katse tulemusel veendusime, et pre-amplifikatsiooni praimerid töötavad korrektselt, kuna 40 tsükli juures oli geelelektroforeesil UV valguse all näha eristuvaid bände (Joonis 5). Antud uuring viidi läbi *CD3D* ja *FOXP3* geeniga. Töös kasutatavate pre-amplifikatsiooni praimerite (Tabel 2) amplikonide pikkusteks oli *CD3D* geeni puhul 373 aluspaari ning *FOXP3* geeni puhul 492 aluspaari.



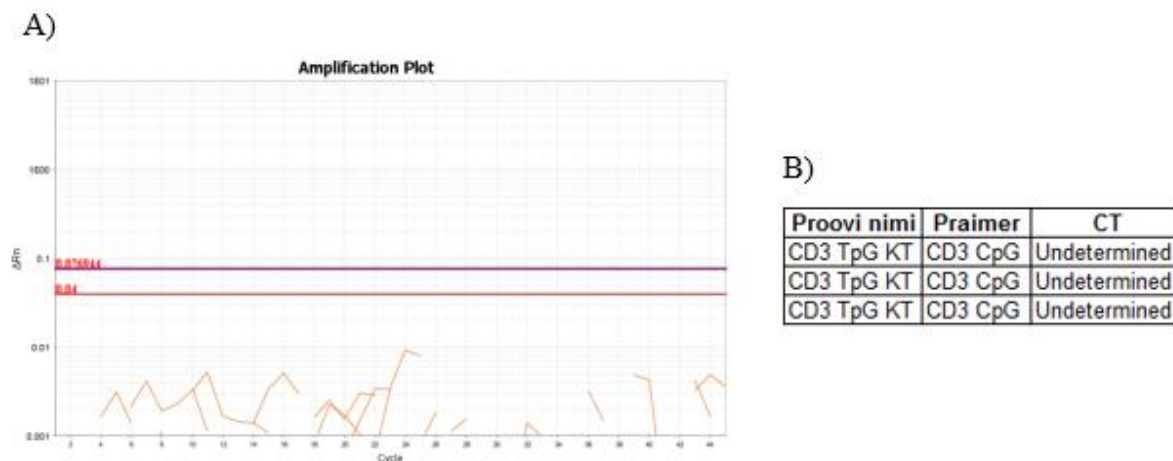
Joonis 5. 40-tsükliline PCR *CD3D* ja *FOXP3* pre-amplifikatsiooni praimeritega. Illustratiivne geelelektroforeesi pilt UV valguse all, millel on selgelt näha amplifitseeritud bisulfitöödeldud DNA bändid.

2.3.2 Metülatsiooni amplikonid

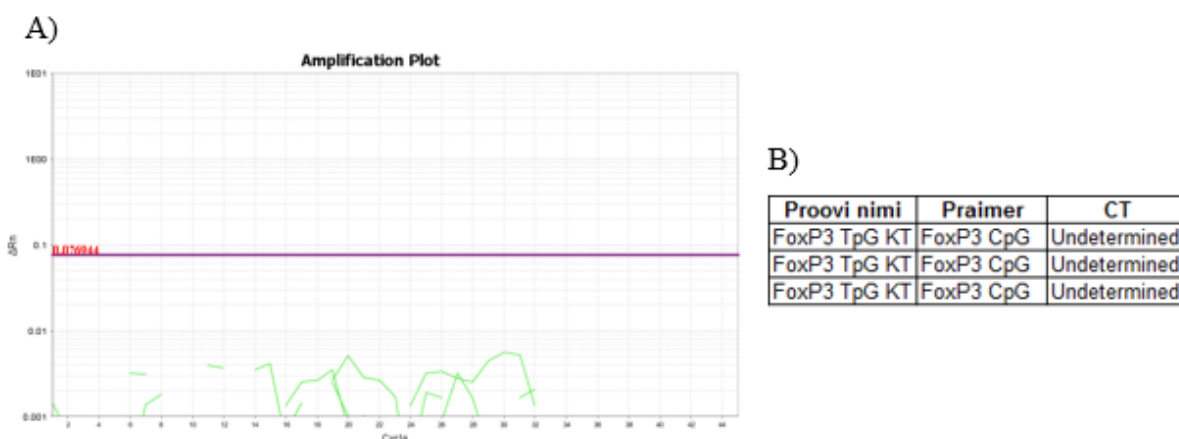
Pre-amplifikatsiooni tulemusel saadi *CD3D* geeni puhul 373 bp ja *FOXP3* puhul 492 bp pikkune amplikon. Antud amplikonide sees asuvad ka qPCR-i põhiste praimerite (Tabel 6) ning sondide seondumiskohad (Joonis 6 ja Joonis 7).

2.3.3 qPCR-i praimerite spetsiifilisus

TaqMan qPCR-il kasutati CpG ja TpG järjestustele spetsiifilisi primereid (Tabel 6). Selleks, et kontrollida praimerite korrektset toimimist ning spetsiifilisust lisati qPCR-il vastavalt CpG praimerile puhul kontrolliks TpG järjestusi sisaldav plasmid ja vastupidi. Antud katse tulemusel veenduti *CD3D* CpG, TpG ja *FOXP3* CpG, TpG praimerite spetsiifilisuses (Joonis 8 ja Joonis 9).



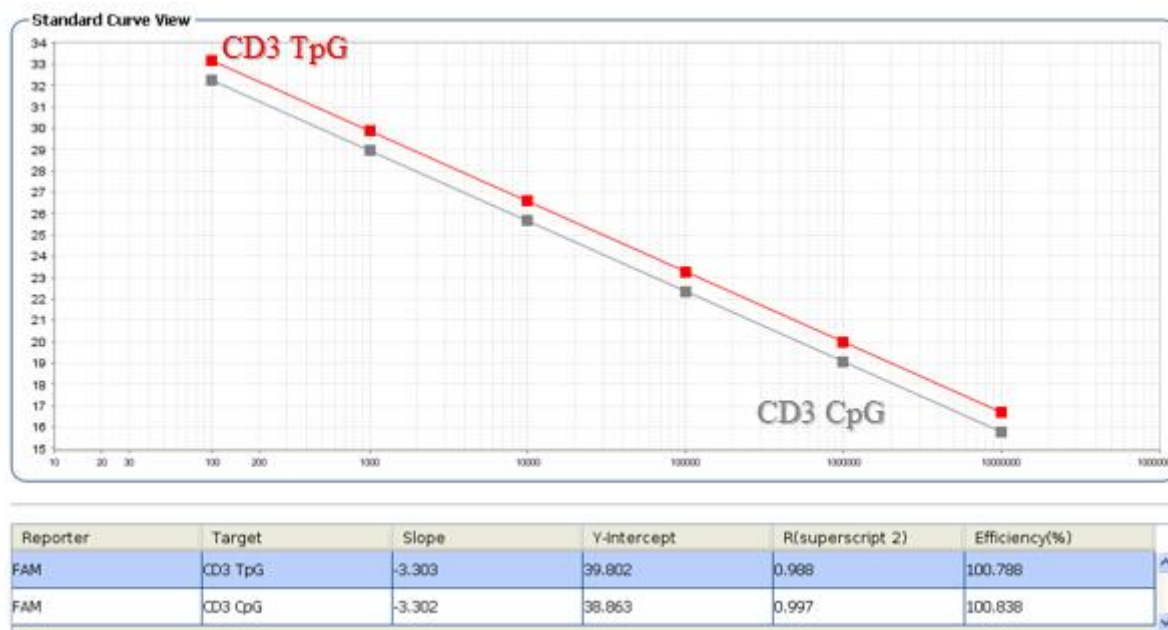
Joonis 8. A) Illustratiivne qPCR-i pilt, mis näitab, kuidas *CD3D* CpG praimerile on lisatud kontrollprooviks *CD3D* TpG plasmidse DNA lahjendus (1:100). B) Illustratiivne qPCR-i analüüs, millelt näeme, kuidas *CD3D* CpG praimerile lisatud *CD3D* TpG plasmidse DNA lahjendust (1:100) ei amplifitseerita ehk CT väärtus on määramatu. *CD3D* TpG spetsiifilisust illustreeriv pilt on näidatud lisades (Lisa 4).



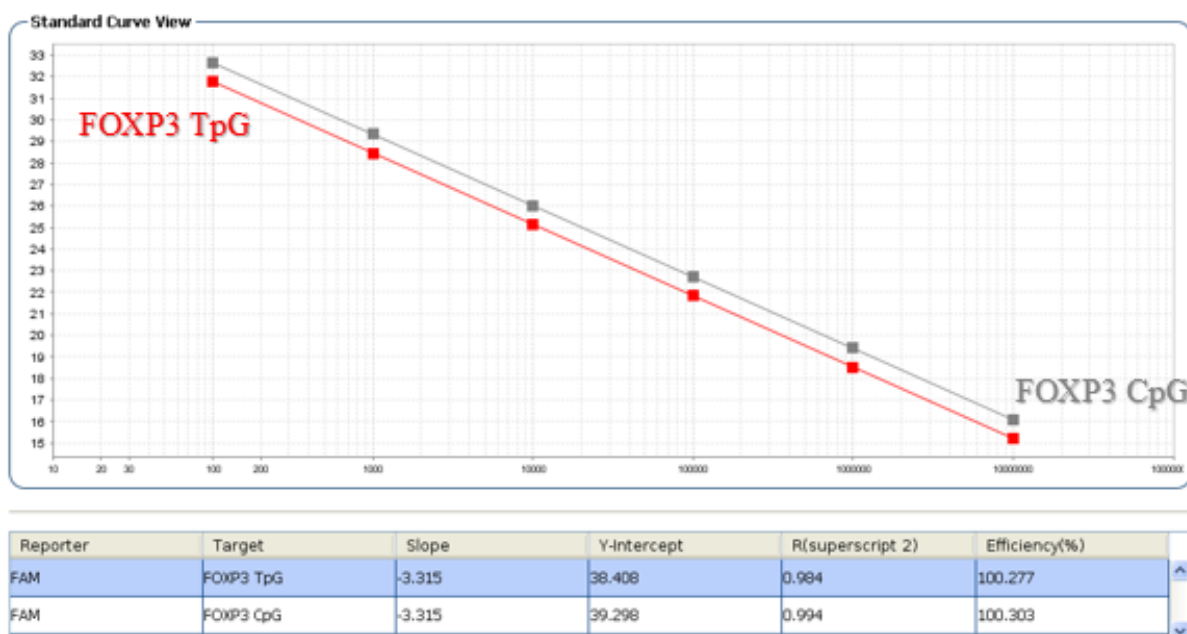
Joonis 9. A) Illustratiivne qPCR-i pilt, kus on *FOXP3* CpG praimerile lisatud kontrolliks *FOXP3* TpG plasmidse DNA lahjendus (1:100). Näeme, et TpG lahjendust ei amplifitseerita. B) Illustratiivne qPCR-i analüüs, mis näitab, et *FOXP3* CpG praimerile lisatud *FOXP3* TpG plasmidse DNA lahjendust (1:100) ei amplifitseerita ehk CT väärtus on määramatu. *FOXP3* TpG praimerite spetsiifilisust näitav pilt on välja toodud lisades (Lisa 5).

2.3.4 CD3D ja FOXP3 standardkõverad

Reaalaja PCR-i tulemusi analüüsiti *Viia*TM 7 programmi põhiselt. Kõigepealt veenduti, et standardkõvera tõus (ingl. k *slope*) oleks -3,3, mis näitab qPCR-i amplifikatsiooni 100%-list efektiivsust (Joonis 10 ja Joonis 11). Järgnevalt hinnati proovide triplikaatide standardhälveid, nimelt kui vähemalt kahe korduse SD>0,2 (Karlen *et al.*, 2007), jäeti proov andmeanalüüsist välja.



Joonis 10. CD3D TpG ja CpG praimer standardkõverad.



Joonis 11. FOXP3 CpG ja TpG standardkõverad.

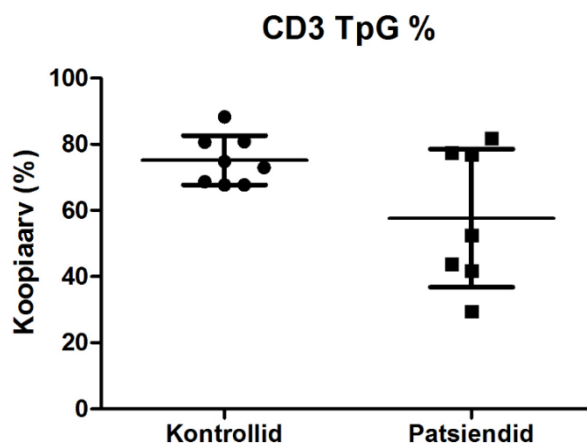
Reaal-aja PCR-i ja standardkõvera tulemuste põhjal arvutas *Viia* 7 tarkvara välja uuritavate proovide CpG- ja TpG-variantide koopiaarvud, millest lähtuvalt arvutati TpG sagedus (%) ($\frac{TpG}{CpG+TpG} \times 100$) valemi põhjal. Saadud TpG protsente võrreldi patsientide ning kontrollide vahel. Statistilise olulisuse määramiseks sooritati paaritu Studenti t-test.

2.3.4 Meetodi korratavus

Meetodi varieeruvuse hindamiseks korraldati kõiki katseid kahel korral (alates genoomse DNA eraldamisest kuni qPCR-ini). Korduskatsete tulemuste põhjal arvutati variatsioonikordjad. Antud eksperimendi käigus oli *CD3D* geeni puhul katsete keskmine variatsioonikordaja 6,3% ning *FOXP3* geeni puhul oli variatsioonikordaja 21,4%. metülatsioonispetsiifiline qPCR on mitmeetapiline protsess, kus juba bisulfitöötluse käigus muutub DNA fragmenteerituks ning kaotab komplementaarsuse. Samuti kaovad järjestustest mittemetüleeritud tsütosiinid. See muudab metülatsioonispetsiifilise qPCR-i komplitseerituks. Seetõttu võib variatsioonikordajat 6% hinnata väga heaks ning 21% vastuvõetavaks.

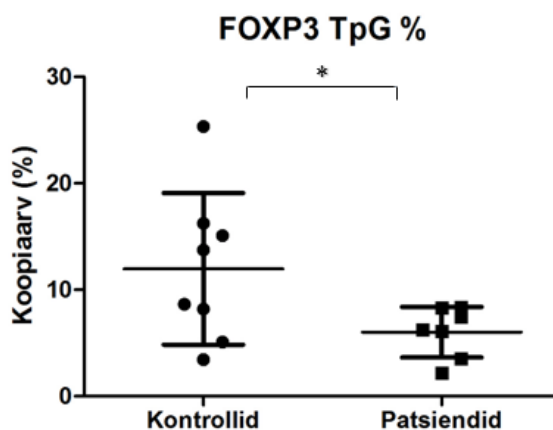
2.3.5 Patsientide ja kontrollide koopiaarvude võrdlus

CD3D geeni puhul on varasemalt näidatud, et $CD4^+$ ja $CD8^+$ T-rakkudes konverteeritakse bisulfitöötluse käigus kõik CpG saidid TpG-ks, seega sisaldavad need T-rakud 99%-lise sagedusega TpG varianti (Sehouli *et al.*, 2011). Perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest (monotsüüdid, T-rakud, B-rakud, NK-rakud) on T-rakud kõige arvukamad. Seetõttu ei ole üllatav, et pea kõigil uuritud on *CD3D* geeni puhul ülekaalus TpG variant. Sooritati kahepoolne paaritu t-test patsientide ning kontrollidega, et võrrelda TpG% ehk T-rakkude sageduses esinevaid erinevusi ning selle statistilist olulisust - p väärtus oli suurem kui $>0,05$ ($p=0,0732$) (Joonis 12). Sellest tulenevalt saame järeldada, et *CD3D* geeni puhul APECED-i patsientide ning kontrollide T-rakkude koopiaarvudes esinevad varieeruvused on tekkinud juhuslikult. *CD3D* TpG sagedus oli antud katses kontrollidel keskmiselt 75% ja patsientidel keskmiselt 58%. Antud eksperimendi käigus oli enamike patsientide ning kontrollide TpG sagedus üle 50%-i, siiski esines ka proove TpG sagedusega alla 50%-i, mis võis olla tingitud juhuslikust varieeruvusest.



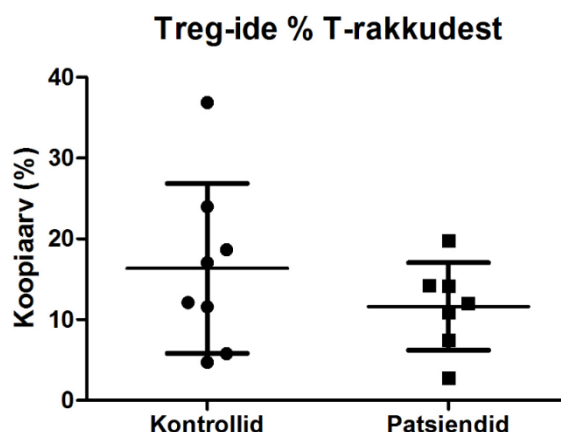
Joonis 12. *CD3D* T-rakkude sageduse (%) võrdlus APECED-i patsientidel ja kontrollidel.

FOXP3 geeni puhul tähistab TpG variant reguleerivaid T-rakke, millel esineb Treg-ide spetsiifiline demetüleeritud regioon ning CpG variant esineb kõigis ülejäänud rakkudes, mille hulgas võib esineda ka aktiveeritud *FOXP3* ekspresseerivaid T-efektorrakke (Sehouli *et al.*, 2011). Varasemates töödes on näidatud, et *FOXP3* TpG ehk reguleerivate T-rakkude arv jääb PBMC-des 6—10% vahele (Wieczorek *et al.*, 2009). *FOXP3* puhul sooritati ühepoolne paaritu t-test, sest varasemalt on näidatud, et APECED-i patsientidel on vähenenud reguleerivate T-rakkude arv. Studenti t-testi põhjal saime p väärtuseks $<0,05$ ($p=0,0283$), millest järeldasime, et APECED-i patsientide ning kontrollide reguleerivate T-rakkude koopiaarvu sagedustes esineb statistiliselt olulisi erinevusi (Joonis 13). Patsientide hulgas oli *FOXP3* TpG sagedus keskmiselt 6% ning kontrollidel keskmiselt 12%.



Joonis 13. *FOXP3* TpG-variandi sageduse (%) võrdlus APECED-i patsientidel ja kontrollidel.

Kui Treg-ide sagedus avaldati protsendina T-rakkudest, siis olulisi erinevusi patsientide ja kontrollisikute vahel ei tuvastatud.



Joonis 14. Treg-ide sagedus T-rakkude hulgas. Treg-ide sageduse erinevus T-rakkude hulgas ei ole kontrollide ja patsientide hulgas oluliselt erinev $>0,05$ ($p=0,1462$).

Käesoleva töö limitatsioonideks on väike uuritavate arv ning *FOXP3* geeni puhul kõrgem varieeruvus võrreldes *CD3D* geeniga. Samuti tuleks edaspidi mõõta uuritud rakupopulatsioonide sagedust voolutsütomeetriliselt ning võrrelda epigeneetiliselt saadud tulemustega.

Kokkuvõttes õnnestus käesoleva töö käigus juurutada TaqMan proovi põhine metülatsioonispetsiifiline qPCR-i meetod, mille põhjal on võimalik hinnata T-rakkude ja regulatoorsete T-rakkude osakaalu perifeerse mononukleaarsete rakkude hulgas. Samuti õnnestus tuvastada varem muude meetoditega kirjeldatud T regulatoorsete rakkude vähenenud osakaalu APECED-i patsientidel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduslik ülevaade käsitles regulatoorsete T-rakkude olemust. Regulaatorsed T-rakud on vajalikud immuuntolerantsuse ning homöostaasi säilitamisel. Põhjalikumalt tutvustati Treg-ide määramist *FOXP3* geenis oleva iseloomuliku demetüleeritud regiooni põhjal. Regulaatorsete rakkude arvu kahanemine võib viia autoimmuunhaiguste tekkele. Kirjandusliku ülevaate teises osas käsitleti põhjalikumalt tüüp 1 autoimmuunset polüendokrinopaatiat, mille puhul on täheldatud vähenenud Treg-ide osakaalu. APECED-i põhjustavad mutatsioonid *AIRE* geenis. *AIRE* geen vastutab autoantigeenide esitlemise ning regulatoorsete T-rakkude tekke eest.

Käesoleval bakalaureusetööl oli kaks eesmärki. Esimeseks eesmärgiks oli juurutada TaqMan reaalaaja qPCR-i põhine meetod, mille kaudu oleks võimalik metülatsoonimustri põhjal tuvastada T-rakkude ja regulatoorsete T-rakkude osakaalu vere mononukleaarsetest rakkudest isoleeritud ning bisulfitöödeldud DNA põhjal. *CD3D* geeni promooter on demetüleeritud ainult T-rakkudes ning *FOXP3* geeni esimeses intronis paiknev konserveerunud järjestus ainult Treg-ides. Näitasime, et *CD3D* ja *FOXP3* geeni diferentsiaalselt metüleeritud regioonidesse disainitud praimerid ja sondid olid spetsiifilised kas metüleeritud järjestusele vastavale CpG-variandile või metüleerimata järjestusele vastavale TpG-variandile ning ei andnud omavahel ristreaktsioone. Meetod osutus üldiselt hästi korratavaks.

Teiseks, sooviti juurutatud meetodi abil võrrelda APECED-i patsientide ning kontrollide T-rakkude ning regulatoorsete T-rakkude osakaalu veres tsirkuleerivate mononukleaarsete rakkude hulgas. Eksperimendi tulemuste põhjal jõudis bakalaureusetöö autor järeldusele, et *CD3D* puhul on nii patsientide kui ka kontrollide seas ülekaalus TpG variant, mis näitas ühtlasi T-rakkude sagedust.

FOXP3 geeni puhul oli ülekaalus CpG-variant, mis esineb kõigis teistes vererakkudes peale Treg-ide ning regulatoorseid T-rakke ehk TpG-variante esines vähesel hulgal. Võrreldes patsientide ning kontrollide TpG sagedusi, saime teha järeldused, et APECED-i patsientidel on võrreldes kontrollisikutega vähenenud Treg-ide osakaal, mis kattub varasemalt näidatud tulemustega, kus Treg-sid määrati voolutsütomeetriselt.

Kinnistamaks praeguseid tulemusi tuleks kindlasti teha veel korduskatseid ning kaasata katsetesse rohkem patsiente ja kontrolle ning kasutada võrdluseks alternatiivseid meetodeid vastavate rakupopulatsioonide määramiseks.

Epigenetic characterization of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy

Liis Haljasmägi

SUMMARY

Regulatory T cells are very important for the maintenance of immunological tolerance and homeostasis. *FOXP3* is essential for the differentiation, function and stability of Tregs. This important cell type is characterized by a conserved sequence in the first intron of *FOXP3* containing CpG dinucleotides that are completely demethylated in Tregs, but totally methylated in other blood cell types, permitting their identification with epigenetic methods. When the number of regulatory T cells decreases, it can result in autoimmune diseases. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), also known as autoimmune polyendocrine syndrome type I (APS-1), is an autoimmune disease which is caused by mutations in the autoimmune regulator (*AIRE*). *AIRE* is a transcription factor, which is responsible for presenting autoantigens to developing T cells. *AIRE*-deficiency results in impaired negative selection. Insufficient negative selection causes excessive release of autoreactive T cells and also, a decrease of regulatory T cells.

The first purpose of the current bachelor thesis was to develop a TaqMan realtime PCR method to determine the percentage of T-cell's and regulatory T cell's using bisulfite converted DNA, isolated from peripheral blood mononuclear cells regarding differential methylation pattern of genes specific for each studied cell type. The promoter of *CD3D* gene is demethylated exclusively in T cells while the conserved region in the first intron of *FOXP3* contains demethylated CpG dinucleotides only in Tregs. The study confirmed that the primers and probes that were designed to these differentially methylated regions were specific either for the methylated (CpG variants) sequences or unmethylated (TpG variants) and did not cross-react with each other showing good specificity. The method showed also good reproducibility.

The second aim of the thesis was to apply this epigenetic method to compare the percentages of circulating Tregs between APECED patients and controls. TpG variant of *CD3D* (corresponding to T cells) was prevalent in the majority of studied individuals and no significant difference was revealed in T cell frequencies between patients and controls. CpG variant dominated in the case of *FOXP3* gene as all the other cells in the blood except for Tregs have methylated CpG dinucleotides in the studied region. We found that regulatory T cell percentages were slightly decreased in APECED patients compared to controls in line with previous publications that have measured Treg frequency with flow cytometry.

To confirm these results higher number of patients and healthy controls should be recruited to the study and for the comparison alternative methods for finding the frequency of corresponding cells should be used.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin saata suured tänusõnad oma toredale juhendajale Kai Kisand'ile, kes kuulas alati rõõmsameelselt ära kõik minu küsimused ning andis head nõu. Tänusõnad saadaksin ka kaasjuhendajatele Pärt Peterson'ile ja Lili Milan'ile. Tänaksin oma pere ja sõpru usina kaasaelamise ja julgestuse eest. Samuti tahaksin tänu avaldada kogu Molekulaarpatoloogia uurimisgrupile, kelle poole sain kõigi oma muredega alati pöörduda.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

Ahonen, P., Myllärniemi, S., Sipilä, I., and Perheentupa, J. (1990). Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N. Engl. J. Med.* 322: 1829–1836.

Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., and Levings, M.K. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 19: 345–354.

Almeida, A.R.M., Legrand, N., Papiernik, M., and Freitas, A.A. (2002). Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J. Immunol.* 169: 4850–4860.

Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., *et al.* (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395–1401.

Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., and Romagnani, S. (2002). Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ human thymocytes. *J. Exp. Med.* 196: 379–387.

Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167: 1245–1253.

Bashour, K.T., Gondarenko, A., Chen, H., Shen, K., Liu, X., Huse, M., Hone, J.C., Kam, L.C., Del Alamo, J.C., Meili, R., *et al.* (2012). T cells can be activated by physical forces acting on T cell receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 5: 33.4.

Betterle, C., Greggio, N.A., and Volpato, M. (1998). Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 1049–1055.

Björnses, P., Halonen, M., Palvimo, J.J., Kolmer, M., Aaltonen, J., Ellonen, P., Perheentupa, J., Ulmanen, I., and Peltonen, L. (2000). Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 378–392.

Chen, X., and Oppenheim, J.J. (2011). Resolving the identity myth: Key markers of functional CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.* 11: 1489–1496.

Chen, X., Bäuml, M., Männel, D.N., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2007). Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* 179: 154–161.

Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M.Z., Männel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008). Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J. Immunol.* 180: 6467–6471.

- Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M.Z., Wiltout, R.H., and Oppenheim, J.J. (2010). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* 40: 1099–1106.
- Collison, L.W., and Vignali, D.A.A. (2011). In vitro Treg suppression assays. *Methods Mol. Biol.* 707: 21–37.
- Cozzo, C., Larkin, J., and Caton, A.J. (2003). Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 171: 5678–5682.
- Du, J., Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., and Patel, D.J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 519–532.
- Ferguson, B.J., Alexander, C., Rossi, S.W., Liiv, I., Rebane, A., Worth, C.L., Wong, J., Laan, M., Peterson, P., Jenkinson, E.J., *et al.* (2008). AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J. Biol. Chem.* 283: 1723–1731.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., *et al.* (2007). Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 5: 0169–0178.
- Gardner, J.M., Devoss, J.J., Friedman, R.S., Wong, D.J., Tan, Y.X., Zhou, X., Johannes, K.P., Su, M.A., Chang, H.Y., Krummel, M.F., *et al.* (2008). Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 321: 843–847.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Mü, W., Sparwasser, T., Fö Rster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3 + Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity* 34: 237–246.
- Heino, M., Peterson, P., Kudoh, J., Nagamine, K., Lagerstedt, A., Ovod, V., Ranki, A., Rantala, I., Nieminen, M., Tuukkanen, J., *et al.* (1999a). Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 821–825.
- Heino, M., Scott, H.S., Chen, Q., Peterson, P., Mäebpää, U., Papasavvas, M.P., Mittaz, L., Barras, C., Rossier, C., Chrousos, G.P., *et al.* (1999b). Mutation analyses of North American APS-1 patients. *Hum. Mutat.* 13: 69–74.
- Huehn, J., and Beyer, M. (2015). Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 27: 10–18.
- Huehn, S., Weiss, S., Hori, A., Hamann, J., Schallenberg, K., Kretschmer, S., Olek, J., Walter, S., Düber, R., Geffers, P., *et al.* (2013). Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus. *J. Immunol. Tartu Univ. Libr.* 190: 3180–3188.
- Husebye, E.S., Perheentupa, J., Rautemaa, R., and Kämpe, O. (2009). Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Intern. Med.* 265: 514–529.

- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13: 484–492.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193: 1285–1294.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, a J., Petrone, a L., Holenbeck, a E., Lerman, M. a, Naji, A., and Caton, a J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2: 301–306.
- Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal T H 2 inflammation. *Nature* 482.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., Mermod, N., Ailenberg, M., Silverman, M., Etienne, W., Meyer, M., Peppers, J., *et al.* (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 8: 131.
- Kekäläinen, E., Tuovinen, H., Joensuu, J., Gylling, M., Franssila, R., Pöntynen, N., Talvensaaari, K., Perheentupa, J., Miettinen, A., and Arstila, T.P. (2007). A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J. Immunol.* 178: 1208–1215.
- Kisand, K., and Peterson, P. (2015). Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy. *J. Clin. Immunol.* 35: 463–478.
- Kisand, K., Bøe Wolff, A.S., Podkrajsek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K. V, Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., *et al.* (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 207: 299–308.
- Kisand, K., Lilic, D., Casanova, J.-L., Peterson, P., Meager, A., and Willcox, N. (2011). Mucocutaneous candidiasis and autoimmunity against cytokines in APECED and thymoma patients: clinical and pathogenetic implications. *Eur. J. Immunol.* 41: 1517–1527.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., and Sakaguchi, S. (2015). Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *Eur. J. Immunol.* 45: 11–16.
- Kitoh, A., Ono, M., Naoe, Y., Ohkura, N., Yamaguchi, T., Yaguchi, H., Kitabayashi, I., Tsukada, T., Nomura, T., Miyachi, Y., *et al.* (2009). Indispensable Role of the Runx1-Cbfb Transcription Complex for In Vivo-Suppressive Function of FoxP3+ Regulatory T Cells. *Immunity* 31: 609–620.
- Kyewski, B., and Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 688–698.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34: 2480–2488.

- Laakso, S.M., Laurinolli, T.T., Rossi, L.H., Lehtoviita, A., Sairanen, H., Perheentupa, J., Kekkonen, E., and Arstila, T.P. (2010). Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3⁺ precursors and impaired activated population. *J. Autoimmun.* 35: 351–357.
- Laan, M., and Peterson, P. (2013). The many faces of Aire in central tolerance. *Front. Immunol.* 4: 326.
- Lee, J.-W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J.E., Cheng, A.C., Yonekura, A., Heath, J.K., and Turley, S.J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 8: 181–190.
- Li, X., Liang, Y., LeBlanc, M., Benner, C., and Zheng, Y. (2014). Function of a Foxp3 cis-Element in Protecting Regulatory T Cell Identity. *Cell* 158: 734–748.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315–322.
- Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., and Goodnow, C.C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat. Immunol.* 4: 350–354.
- Liu, B., Tahk, S., Yee, K.M., Fan, G., and Shuai, K. (2010). The Ligase PIAS1 Restricts Natural Regulatory T Cell Differentiation by Epigenetic Repression. *Sci. Transl. Med.* 330: 521–525.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., *et al.* (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* 203: 1701–1711.
- Malchow, S. (2013). Aire-Dependent Thymic Development of Tumor-Associated Regulatory T Cells. *Science* 1219: 1219–1224.
- Malchow, S., Leventhal, D.S., Lee, V., Nishi, S., Socci, N.D., Savage Correspondence, P.A., and Savage, P.A. (2016). Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity* 44: 1–12.
- Malek, T.R., Yu, A., Zhu, L., Matsutani, T., Adeegbe, D., and Bayer, A.L. (2008). IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J. Clin. Immunol.* 28: 635–639.
- Mantel, P.Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176: 3593–3602.
- Matsumoto, M. (2011). Contrasting models for the roles of Aire in the differentiation program of epithelial cells in the thymic medulla. *Eur. J. Immunol.* 41: 12–17.
- Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H.J., Waldmann, H., Huehn, J., and Hori, S. (2012). Plasticity of Foxp3⁺ T Cells Reflects Promiscuous Foxp3 Expression in Conventional T Cells but Not Reprogramming of Regulatory T Cells. *Immunity* 36: 262–275.

- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., *et al.* (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* 30: 899–911.
- Morikawa, H., Ohkura, N., Vandenbon, A., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., Lassmann, T., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Forrest, A.R.R., *et al.* (2014). Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 5289–5294.
- Myhre, A.G., Halonen, M., Eskelin, P., Ekwall, O., Hedstrand, H., Rorsman, F., Kämpe, O., and Husebye, E.S. (2001). Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS I) in Norway. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 54: 211–217.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J.E., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., *et al.* (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* 17: 393–398.
- Nair, V.S., and Oh, K.I. (2014). Down-regulation of Tet2 prevents TSDR demethylation in IL2 deficient regulatory T cells.
- Ng, W.F., Duggan, P.J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A.D., Isaacs, J.D., and Lechler, R.I. (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98: 2736–2744.
- Nishikawa, Y., Nishijima, H., Matsumoto, M., Morimoto, J., Hirota, F., Takahashi, S., Luche, H., Fehling, H.J., Mouri, Y., and Matsumoto, M. (2014). Temporal lineage tracing of Aire-expressing cells reveals a requirement for Aire in their maturation program. *J. Immunol.* 192: 2585–2592.
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., *et al.* (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity* 37: 785–799.
- Ohkura, N., Kitagawa, Y., and Sakaguchi, S. (2013). Immunity Review Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity* 38: 414–423.
- Overacre, A.E., and Aa Vignali, D. (2016). Treg stability: to be or not to be. *Curr. Opin. Immunol.* 39: 39–43.
- Papiernik, M. (1998). Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int. Immunol.* 10: 371–378.
- Park, H.J., Park, J.S., Jeong, Y.H., Son, J., Ban, Y.H., Lee, B.-H., Chen, L., Chang, J., Chung, D.H., Choi, I., *et al.* (2015). PD-1 Upregulated on Regulatory T Cells during Chronic Virus Infection Enhances the Suppression of CD8⁺ T Cell Immune Response via the Interaction with PD-L1 Expressed on CD8⁺ T Cells. *J. Immunol.* 194: 5801–5811.
- Perheentupa, J. (2002). APS-I/APECED: the clinical disease and therapy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 31: 295–320, vi.

- Perheentupa, J. (2006). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 2843–2850.
- Peterson, P., Pitkänen, J., Sillanpää, N., and Krohn, K. (2004). Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED): a model disease to study molecular aspects of endocrine autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 135: 348–357.
- Podkrajsek, K.T., Bratanic, N., Krzysnik, C., and Battelino, T. (2005). Autoimmune regulator-1 messenger ribonucleic acid analysis in a novel intronic mutation and two additional novel AIRE gene mutations in a cohort of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 4930–4935.
- Polansky, J.K., Schreiber, L., Thelemann, C., Ludwig, L., Krüger, M., Baumgrass, R., Cording, S., Floess, S., Hamann, A., and Huehn, J. (2010). Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *J. Mol. Med.* 88: 1029–1040.
- Poliani, P.L., Kisand, K., Marrella, V., Ravanini, M., Notarangelo, L.D., Villa, A., Peterson, P., and Facchetti, F. (2010). Human peripheral lymphoid tissues contain autoimmune regulator-expressing dendritic cells. *Am. J. Pathol.* 176: 1104–1112.
- Read, S., Malmström, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192: 295–302.
- Rosatelli, M.C., Meloni, A., Meloni, A., Devoto, M., Cao, A., Scott, H.S., Peterson, P., Heino, M., Krohn, K.J., Nagamine, K., *et al.* (1998). A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients. *Hum. Genet.* 103: 428–434.
- Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., and Rudensky, A.Y. (2010). Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329: 1667–1671.
- Rudra, D., Egawa, T., Chong, M.M.W., Treuting, P., Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2009). Runx-CBFbeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 10: 1170–1177.
- Ryan, K.R., Lawson, C.A., Lorenzi, A.R., Arkwright, P.D., Isaacs, J.D., Lilic, D., Lilic, D., Anderson, M.S., Venanzi, E., Klein, L., *et al.* (2005). CD4+CD25+ T-regulatory cells are decreased in patients with autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 1158–1159.
- Sakaguchi, S. (2004). NATURALLY ARISING CD4 + REGULATORY T CELLS FOR IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE AND NEGATIVE CONTROL OF IMMUNE RESPONSES. *Annu. Rev. Immunol* 22: 531–562.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Publ. Gr.* 10.
- Samstein, R.M., Josefowicz, S.Z., Arvey, A., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2012).

Extrathymic Generation of Regulatory T Cells in Placental Mammals Mitigates Maternal-Fetal Conflict. *Cell* 150: 29–38.

Scott, H.S., Heino, M., Peterson, P., Mittaz, L., Lalioti, M.D., Betterle, C., Cohen, A., Seri, M., Lerone, M., Romeo, G., *et al.* (1998). Common mutations in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients of different origins. *Mol. Endocrinol.* 12: 1112–1119.

Sehouli, J., Loddenkemper, C., Cornu, T., Schwachula, T., Hoffmüller, U., Grützkau, A., Lohneis, P., Dickhaus, T., Gröne, J., Kruschewski, M., *et al.* (2011). Epigenetic quantification of tumor-infiltrating T-lymphocytes. *Epigenetics* 6: 236–246.

Shevach, E.M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195–201.

Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of Foxp3 + T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30: 636–645.

Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 14: 204–220.

Stadler, M.B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Schöler, A., van Nimwegen, E., Wirbelauer, C., Oakeley, E.J., Gaidatzis, D., *et al.* (2011). DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* 480: 490–495.

Stolarski, B., Pronicka, E., Korniszewski, L., Pollak, A., Kostrzewa, G., Rowińska, E., Włodarski, P., Skórka, A., Gremida, M., Krajewski, P., *et al.* (2006). Molecular background of polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome in a Polish population: novel AIRE mutations and an estimate of disease prevalence. *Clin. Genet.* 70: 348–354.

Zelenika, D., Adams, E., Humm, S., Graca, L., Thompson, S., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2002). Regulatory T Cells Overexpress a Subset of Th2 Gene Transcripts. *J. Immunol.* 168: 1069–1079.

Zeng, H., and Chi, H. (2015). Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.* 36: 3–12.

Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463.

Zlotogora, J., and Shapiro, M.S. (1992). Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews. *J. Med. Genet.* 29: 824–826.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192: 303–310.

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008).

Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* 9: 194–202.

Tran, D.Q., Andersson, J., Hardwick, D., Bebris, L., Illei, G.G., and Shevach, E.M. (2009). Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113: 5125–5133.

Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445: 766–770.

Wang, L., Liu, Y., Han, R., Beier, U.H., Thomas, R.M., Wells, A.D., and Hancock, W.W. (2013). Mbd2 promotes foxp3 demethylation and T-regulatory-cell function. *Mol. Cell. Biol.* 33: 4106–4115.

Wieczorek, G., Asemissen, A., Model, F., Turbachova, I., Floess, S., Liebenberg, V., Baron, U., Stauch, D., Kotsch, K., Pratschke, J., *et al.* (2009). Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.* 69: 599–608.

Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* 8: 277–284.

Wolff, A.S.B., Oftedal, B.E. V, Kisand, K., Ersvær, E., Lima, K., and Husebye, E.S. (2010). Flow cytometry study of blood cell subtypes reflects autoimmune and inflammatory processes in autoimmune polyendocrine syndrome type i. *Scand. J. Immunol.* 71: 459–467.

Xu, L., Kitani, A., Stuelten, C., McGrady, G., Fuss, I., and Strober, W. (2010). Positive and Negative Transcriptional Regulation of the Foxp3 Gene is Mediated by Access and Binding of the Smad3 Protein to Enhancer I. *Immunity* 33: 313–325.

Yang, S., Fujikado, N., Kolodin, D., Benoist, C., and Mathis, D. (2015). Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science* 348: 589–594.

Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., *et al.* (2008). Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J. Exp. Med.* 205: 2827–2838.

B) Raamat

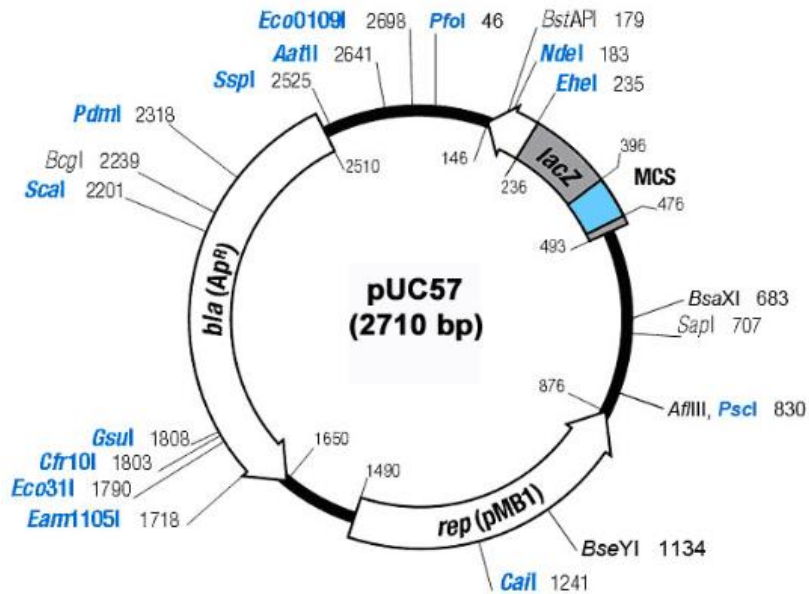
Raivo Uiibo, Kalle Kisand, Pärt Peterson, Koit Reimand 2015. Immunoloogia. Õpik kõrgkoolidele. Regulaatoorsed T-rakud, p. 203—205. Tartu Ülikooli Kirjastus, Eesti.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

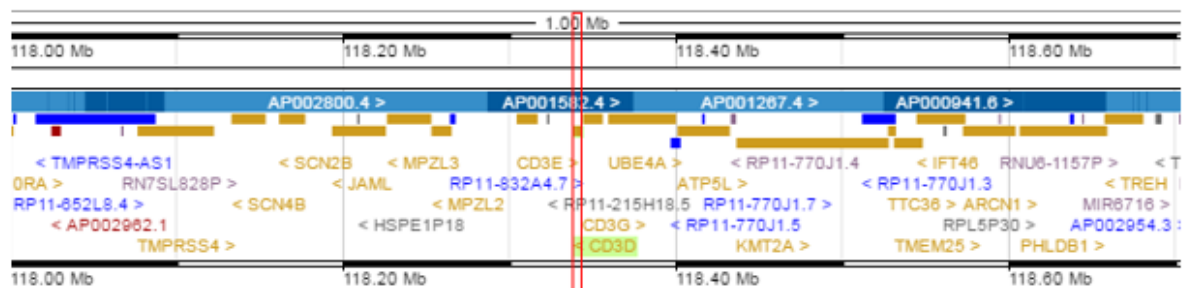
1. [http://www.cell.com/trends/cognitive-sciences/fulltext/S1364-6613\(15\)00101-1](http://www.cell.com/trends/cognitive-sciences/fulltext/S1364-6613(15)00101-1)
2. http://www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57_plasmid_DNA.html

LISAD

Lisa 1. pUC57 kloneerimisvektor.²



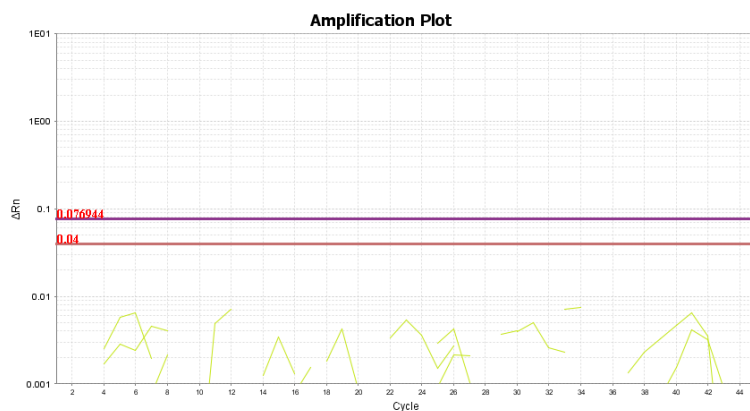
Lisa 2. CD3D TpG qPCR-i amplikon. Antud joonisel on kujutatud *CD3D* genoomset DNA järjestust, mis asub *CD3D* geeni promooteralas. qPCR-i praimerid asuvad amplikonide otstes ning sond *F* ja *R* praimerid vahepealses alas. (Allajoonitud nukleotiidid – *Forward* ja *Reverse* praimerid; läbikriipsutatud nukleotiidid – sond; roheliseks värvitud CG – CpG saidid)



5' GGTGGTTTGAATTTTAGTGTGTTTTTATTGATAATGTAATTATATTTATATATAATTTAAATATTGTT
ATATTTTGAAGTTTTTTGACAGAACTTCTTGGTTTTTATACTGTAAGTCTAGTAGTTAGATTTTT 3'

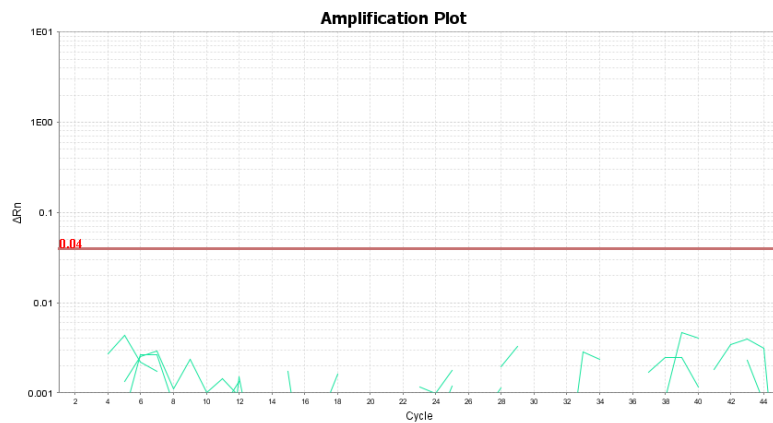
² http://www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57_plasmid_DNA.html

Lisa 4. A) Illustratiivne qPCR-i pilt, kus on *CD3D* TpG praimerile lisatud kontrolliks *CD3D* CpG plasmiidse DNA lahjendus (1:100). Näeme, et CpG lahjendust ei amplifitseerita. B) Illustratiivne qPCR-i analüüs, mis näitab, et *CD3D* TpG praimerile lisatud *CD3D* CpG plasmiidse DNA lahjendust (1:100) ei amplifitseerita ehk CT väärtus on määramatu.



Proovi nimi	Praimer	CT
CD3 CpG KT	CD3 TpG	Undetermined
CD3 CpG KT	CD3 TpG	Undetermined
CD3 CpG KT	CD3 TpG	Undetermined

Lisa 5. A) Illustratiivne qPCR-i pilt, kus on *FOXP3* TpG praimerile lisatud kontrolliks *FOXP3* CpG plasmidse DNA lahjendus (1:100). Näeme, et CpG lahjendust ei amplifitseerita. B) Illustratiivne qPCR-i analüüs, mis näitab, et *FOXP3* TpG praimerile lisatud *FOXP3* CpG plasmidse DNA lahjendust (1:100) ei amplifitseerita ehk CT väärtus on määramatu.



Proovi nimi	Praimer	CT
FoxP3 CpG KT	FoxP3 TpG	Undetermined
FoxP3 CpG KT	FoxP3 TpG	Undetermined
FoxP3 CpG KT	FoxP3 TpG	Undetermined

LIHTLITSENTS

Mina, Liis Haljasmägi (sünnikuupäev 28.08.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Regulatoorsete T-rakkude epigeneetiline iseloomustamine primaarse immuunpuudulikkusega haigetel“, mille juhendajad on Kai Kisand, Pärt Peterson ja Lili Azin Milani,

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi Dspace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi Dspace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016